

510,355

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



05 OCT 2004



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Oktober 2003 (16.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/084551 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 31/69**, 31/11, 38/06, 31/16
- (74) Anwalt: **HELBIG, Christian**; Frohwitter Patent- und Rechtsanwälte, Postfach 86 03 68, 81630 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/01213
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
4. April 2003 (04.04.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 16 227.1 5. April 2002 (05.04.2002) DE
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **VIROMICS GMBH** [DE/DE]; Karl-Liebknecht-Strasse 22, 07743 Jena (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **SCHUBERT, Ulrich** [DE/DE]; Jenaische Strasse 51, 07407 Uhlstädt (DE). **WILL, Hans** [DE/DE]; Paul-Sorge-Strasse 60a, 22549 Hamburg (DE). **SIRMA, Hüseyin** [DE/DE]; Am Deich 18, 23553 Elmshorn (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: AGENTS FOR TREATING <I>FLAVIVIRIDAE</I> INFECTIONS

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR BEHANDLUNG VON FLAVIVIRIDAE-INFEKTIONEN

(57) Abstract: The invention relates to agents used in the treatment, therapy and inhibition of *Flaviviridae* virus infections containing, as active constituents, proteasome inhibitors. The agents, which are used for inhibiting the release, maturation and replication of *Flaviviridae*, in pharmaceutical preparations contain, as active constituents, substance classes which are similar in that they inhibit the 26S proteasome. This includes, above all, proteasome inhibitors that influence the activities of the ubiquitin/proteasome pathway, particularly the enzymatic activities of the 26S and of the 20S proteasome complex. The invention is used in the antiviral therapy of *Flaviviridae* infections, especially in preventing the establishment and the sustainment of a chronic hepatitis C virus infection and of hepato-pathogenesis associated therewith.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Mittel zur Behandlung, Therapie und Hemmung von Flaviviridae-Virusinfektionen, die als wirksame Komponente Proteasom-Inhibitoren enthalten. Die zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Flaviviridae eingesetzten Mittel in pharmazeutischen Zubereitungen enthalten als wirksame Komponente Substanzklassen, denen gemeinsam ist, dass sie das 26S Proteasom in Zellen inhibieren. Dazu gehören vor allem Proteasom-Inhibitoren, welche die Aktivitäten des Ubiquitin/Proteasom-Pathway beeinflussen, insbesondere die enzymatischen Aktivitäten des 26S und des 20S Proteasom-Komplexes. Die Anwendung der Erfindung liegt in der anti-viralen Therapie von Flaviviridae-Infektionen, speziell in der Verhinderung der Etablierung sowie der Aufrechterhaltung einer chronischen Hepatitis-C-Virus-Infektion und einer damit assoziierten Hepatopathogenese.

WO 03/084551 A1

Best Available Copy

Mittel zur Behandlung von *Flaviviridae*-Infektionen

Beschreibung

5

[0001] Die Erfindung betrifft Mittel (Proteasom-Inhibitoren) zur Vorbeugung, Behandlung, Therapie und Hemmung der von verschiedenen Mitgliedern der Virusfamilie *Flaviviridae* (Genera: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus*) verursachten Krankheiten beim Menschen und bei Tieren. Dies betrifft insbesondere die durch Hepaciviren (Hepatitis-C-Viren oder HCVs; 10 Abkürzungsverzeichnis hinter den Beispielen) verursachten Krankheiten, speziell Hepatitis beim Menschen. Darüber hinaus betrifft dies die von Pestiviren wie BVDV (Virus der bovinen viralen Diarrhoe) und CSFV (Virus der klassischen Schweinepest) verursachten Krankheiten bei Tieren und die von Flaviviren wie zum Beispiel West-Nil-, Dengue- und Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) Viren verursachten Krankheiten bei Menschen und 15 Tieren.

15

[0002] Die Anwendung der erfindungsgemäßen Mittel in pharmazeutischen Zubereitungen führt vorwiegend oder ausschließlich zur Freisetzung von nicht infektiösen Viren aus infizierten Zellen. Die gleichen Mittel können die Ausbreitung einer akuten Infektion in Zellkulturen wie auch im infizierten Organismus begrenzen, da alle Nachkommenviren, produziert unter 20 Behandlung mit diesen Mitteln, nicht oder so gut wie nicht infektiös sind. Des weiteren sind die Mittel für nicht proliferierende Hepatozyten und Non-Parenchymzellen der Leber weniger toxisch als für Hepatomazellen. Damit sind diese Mittel für eine bevorzugte Zerstörung von Leberkarzinomzellen geeignet, zum Beispiel von hepatozellulären Karzinomen (HCC) in HCV-infizierten Patienten. Bei den Mitteln handelt es sich um verschiedene Substanzklassen, 25 welchen gemeinsam ist, dass sie das 26S Proteasom in Zellen inhibieren. Am Beispiel von Vertretern der Genera *Flavivirus* und *Pestivirus* wird gezeigt, dass diese Mittel, die Proteasom-Inhibitoren, die Freisetzung von infektiösen Viren aus infizierten Wirtszellen drastisch reduzieren. Das Pestivirus BVDV dient dabei aufgrund einer ausgeprägten Homologie sowohl der Struktur des Viruspartikels als auch der Genomorganisation als Surrogat-Modell für das 30 HCV, für das selbst kein infektiöses Zellsystem zur Verfügung steht. Markantestes Anwendungsbeispiel für diese Erfindung sind die anti-virale Therapie von Hepatitis-Infektionen, speziell zur Verhinderung der Etablierung sowie der Aufrechterhaltung einer akuten und chronischen HCV-Infektion. Weiter Anwendungsbeispiele betreffen die Behandlung von BVDV-Infektionen beim Rind und CSFV-Infektionen beim Schwein. Darüber können diese 35 Mittel auch bei der Vorbeugung und Behandlung von Infektionskrankheiten Anwendung finden, die von Flaviviren wie West-Nil-Virus, Gelbfieber-Virus, Dengue-Virus und Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) Virus verursacht werden. Dem bisherigen Erkenntnisstand

zufolge ist davon auszugehen, dass mit Proteasom-Inhibitoren die Virämie sowohl bei einer Neuinfektion als auch bei chronischen Infektionen unterdrückt und der Erfolg einer Viruseliminierung durch das eigene Immunsystem und/oder durch bekannte Mittel mit ähnlicher oder anderer Wirkung erhöht werden kann. Die Folgen zum Beispiel einer HCV-Infektion - wie z.B. Leberschädigungen unterschiedlichen Schweregrades bis hin zur Entwicklung einer Leberzirrhose/Fibrose oder eines Leberkarzinoms - können durch den Einsatz von Proteasom-Inhibitoren verhindert, gemindert oder revertiert werden.

Charakteristik des bekannten Standes

0. Einleitung

[0003] Eines der größten Weltgesundheitsprobleme (ca. 3% der Weltbevölkerung sind betroffen) ist die Infektion mit Hepatitis-C-Virus (HCV). Wichtigstes Merkmal von HCV-Infektionen ist ein oft lebenslang andauernder chronischer Virus-Trägerstatus der betroffenen Personen: Mehr als 70% der HCV-Infizierten entwickeln eine chronische Hepatitis, die zu chronisch aktiver Hepatitis verschiedener Schweregrade bis hin zu Leberzirrhose und Fibrose (10-20% aller Fälle) führen kann. Unabhängig davon entstehen bei 1 bis 5% der chronisch Infizierten primäre hepatozelluläre Karzinome (HCC; für Reviews siehe Lindenbach and Rice, 2001 sowie Major *et al.*, 2001). Darüber hinaus werden HCV-Infektionen ursächlich noch mit mehr als 30 weiteren Erkrankungen beim Menschen in Verbindung gebracht, darunter mit bedeutenden Autoimmunerkrankungen wie der Typ II Kryoglobulinämie (mixed type II cryoglobulinemia, MC; Agnello, 2000). HCV-Infizierte werden in der Regel mit einer Kombination von Interferon-alpha und Ribavirin behandelt. Diese Methode ist aber mit starken Nebenwirkungen behaftet und führt nur in etwa der Hälfte aller Fälle zur Eliminierung des Virus aus dem Körper. Diese unbefriedigende Situation liegt zum einen an der generell breiten Vielfalt der HCV-Varianten: Zur Zeit werden sechs Genotypen unterschieden; diese lassen sich wiederum in eine Reihe von Subtypen und Stämmen diversifizieren (für Review siehe Bukh *et al.*, 1995). Zum anderen entwickeln sich in den chronisch infizierten Individuen eine Vielzahl neuer genetischer Varianten. Die genetische Variabilität von HCV ist wahrscheinlich auch die Ursache für die ineffiziente Immunantwort, die bei der Mehrheit der HCV-Infizierten beobachtet werden kann. Aus diesem Grund konnten bisher weder prophylaktische noch therapeutische Impfmethoden entwickelt werden. Auch die passive Gabe von HCV-spezifischen neutralisierenden Antikörpern und/oder Medikamenten bei Lebertransplantierten verhindert oft nicht die Neuinfektion der transplantierten Leber. Immunsuppression von Patienten mit abklingenden Hepatiden oder nach einer Lebertransplantation kann zur Reaktivierung von latent vorhandenen Viren führen. Um die Probleme der bisher verfügbaren antiviralen und therapeutischen Mittel für die Hepatitis C zu umgehen, sind neue Therapieansätze notwendig. Vor dem Hintergrund der Virusvariabilität sind dabei vor allem solche Methoden von großer

Bedeutung, die konservierte zelluläre Faktoren beeinflussen, die für die Vermehrung dieser Viren in der Wirtszelle essentiell sind. Solche Mittel werden in dieser Erfindung beschrieben. Da bisher weder effizient infizierbare Zellen in Kultur noch ein praktikables Tiermodell für HCV zur Verfügung stehen, wurden hierzu Studien mit dem HCV-verwandten Pestivirus BVDV durchgeführt. Die Ähnlichkeit des Lebenszyklus von BVDV und HCV wurde in einer Reihe vorangehender Arbeiten demonstriert (für Review siehe Lindenbach and Rice, 2001). Darüber hinaus wurden Experimente mit einem anderen, phylogenetisch weiter entfernten Vertreter der *Flaviviridae* Familie, dem West-Nil Flavivirus, durchgeführt. Die Erfindung betrifft die überraschende Erkenntnis, dass Inhibitoren des zellulären 26S Proteasoms die Produktion von infektiösen Viren sowohl aus BVDV als auch aus West-Nil-Virus-infizierten Zellen verhindern. Der homologe Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die Vermehrung von Pestiviren und Flaviviren impliziert einen ähnlichen Wirkmechanismus dieser Mittel bei allen Vertretern der *Flaviviridae* Familie; dieser beruht wahrscheinlich ursächlich auf der homologen Struktur der Virionen der *Flaviviridae*. Neben der antiviralen Wirkung wurde festgestellt, dass der zytotoxische Effekt von Proteasom-Inhibitoren bei Hepatomazellen (Leberkrebszellen), die sich schnell teilen, signifikant stärker ausgeprägt ist als bei langsam teilenden primären Hepatozyten. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Proteasom-Inhibitoren besonders für die Therapie von HCV-verursachten Lebererkrankungen und Leberkarzinomen geeignet. Die Wirkung von Proteasomen-Inhibitoren auf Pestiviren legt nahe, diese Mittel bei der Bekämpfung der verbreiteten Tierpathogene BVDV (Ursache von boviner Virus-Diarrhoe und boviner mucosal disease, MD) und CSFV (Ursache der Schweinepest) einzusetzen (für Review siehe Thiel, 1996). Die Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf die Vermehrung von Flaviviren eröffnet Anwendungsmöglichkeiten bei zahlreichen durch Flaviviren verursachten Krankheiten beim Menschen und bei Tieren, darunter Fieber, Enzephalitiden und Hämorrhagien. Bedeutungsvoll ist in diesem Kontext vor allem das Dengue-Fieber-Virus, gegen das es bisher nur unzureichende Vakzine und Behandlungsformen gibt (für Review, siehe Burke and Monath, 2001).

1. Funktion des Ubiquitin/Proteasom-Pathway

[0004] Proteasomen stellen die hauptsächliche proteolytische Komponente im Zellkern und Zytosol aller eukaryotischen Zellen dar. Es sind multikatalytische Enzymkomplexe, die ca. 1% der Gesamt-Zellproteine ausmachen. Proteasomen üben eine vitale Rolle in vielfältigen Funktionen des Zellmetabolismus aus. Die hauptsächliche Funktion ist die Proteolyse von missgefalteten, nicht-funktionellen Proteinen und der schnelle Abbau regulatorischer Proteine. Eine weitere Funktion hat der proteasomale Abbau von zellulären oder viralen Proteinen für die T-Zell-vermittelte Immunantwort durch die Generierung von Peptidliganden für Major Histocompatibilitäts Klasse-I-Moleküle (für Review siehe Rock und Goldberg, 1999). Protea-

som-Targets werden in der Regel durch die Anheftung von oligomeren Formen von Ubiquitin (Ub) für den Abbau markiert. Ub ist ein hochkonserviertes, 76 Aminosäuren langes Protein, das kovalent an Targetproteine gekoppelt wird. Die Ubiquitinylierung selbst ist reversibel, und Ub-Moleküle können durch eine Vielzahl von Ub-Hydrolasen von dem Targetmolekül wieder entfernt werden. Die Verbindung zwischen der Ubiquitinylierung von Targetproteinen und der proteasomalen Proteolyse wird allgemein als Ubiquitin/Proteasom-System (UPS) bezeichnet (für Review siehe Rock und Goldberg, 1999; Hershko und Ciechanover, 1998).

[0005] Das 26S Proteasom ist ein 2.5 Mda großer Multienzym-Komplex, welcher aus ca. 31 Untereinheiten besteht. Die proteolytische Aktivität des Proteasom-Komplexes wird durch eine zylinderförmige, 700 kDa große und aus vier übereinander liegenden Ringen bestehende Core-Struktur, dem 20S Proteasom, realisiert. Das 20S Proteasom bildet einen aus 14 nicht identischen Proteinen bestehenden komplizierten Multienzymkomplex, der in zwei α - und zwei β -Ring in einer $\alpha\beta\alpha$ -Reihenfolge angeordnet ist. Die Substratspezifität des 20S Proteasom umfasst drei wesentliche Aktivitäten: Trypsin-, Chymotrypsin- und Postglutamyl-Peptid hydrolysierende- (PGPH) oder auch Kaspase-ähnliche Aktivitäten, welche in den β -Untereinheiten Z, Y und Z lokalisiert sind. Das 20S Proteasom degradiert in vitro denaturierte Proteine unabhängig von deren Poly-Ubiquitinylierung. Dagegen werden in vivo enzymatische Aktivitäten des 20S Proteasoms durch Anlagerung der 19S regulatorischen Untereinheiten reguliert, welche zusammen das aktive 26S Proteasom Partikel bilden. Die 19S regulatorischen Untereinheiten sind bei der Erkennung von poly-ubiquitinylierten Proteinen sowie bei der Entfaltung von Targetproteinen beteiligt. Die Aktivität des 26S Proteasom ist ATP-abhängig und degradiert fast ausschließlich nur poly-ubiquitinylierte Proteine (für Review siehe Hershko und Ciechanover, 1998).

1.1. Bedeutung des UPS in der Pathogenese klinisch relevanter Krankheiten

[0006] Die zentrale Rolle des UPS in der Zelle erklärt die Bedeutung dieses Systems für zahlreiche pathologische Erscheinungen (für Review siehe Ciechanover et al., 2000). Beispielsweise ist der Level des Tumorsuppressor-Proteins p53 in besonders aggressiven Formen von zervikalen Karzinomen extrem niedrig, die durch bestimmte Isolate des Humanen Papillomavirus (HPV) ausgelöst werden. Das HPV onco-Protein E6 induziert den Abbau des Suppressorproteins p53 über das UPS.

[0007] Bei der Entstehung von colorektalem Cancer spielt β -Catenin, ein über das UPS regulierter zellulärer Faktor, eine wichtige Rolle in der Signal-Transduktion und Differenzierung von colorektalem Epithelium. Außerdem besteht eine Korrelation zwischen dem Level an p27, einem G1-Cyclin CDK-Inhibitor und dem Entstehen von colorektalen Cancer und Brustkrebs. Der Abbau von p27 durch das UPS ist entscheidend für den Übergang von G1- zur S-Phase während der Zellteilung.

[0008] Eine Rolle des UPS bei Erbkrankheiten ist bekannt, so für den Pathomechanismus von Cystischer Fibrosis, dem Angelmans-Syndrom sowie dem Liddle-Syndrom. Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen spielt das UPS eine Rolle: Die Akkumulation von Ubiquitin-Konjugaten wurde in pathologischen Läsionen bei Alzheimer und Parkinson berichtet. Bei 5 Huntington akkumulieren die Proteine Huntingtin und Ataxin in Proteasom-aktiven nukleären Strukturen im Zellkern. Eine zentrale Funktion übt das UPS bei Erkrankungen des Immunsystems aus. Zum einen ist der 26S Proteasom-Komplex die hauptsächliche Protease in der MHC-I-Antigenprozessierung, und zum anderen kann die Aktivität des Proteasoms selbst sowohl durch γ -Interferon induzierbare katalytische β -Untereinheiten als auch durch die regulatorische Untereinheit PA28 manipuliert werden. Viele entzündliche und immunologische 10 Krankheiten stehen im Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher verschiedene Gen-Funktionen in der Immunantwort reguliert. Die Aktivierung von NF- κ B, die durch Ubiquitinylierung und spezifische Spaltung eines Vorläuferproteins durch das Proteasom gesteuert wird, führt zur erhöhten Expression von verschiedenen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, entzündlichen und Stress-Response-Proteinen sowie Immunrezeptoren. 15

[0009] Diese Zusammenhänge erklären das Interesse an einer pharmakologischen Anwendung von Substanzen, die das UPS regulieren.

1.2. Proteasom-Inhibitoren

20 [0010] Verschiedene Substanzklassen sind als Proteasom-Inhibitoren bekannt. Es sind zum einen chemisch modifizierte Peptidaldehyde wie der Tripeptidaldehyd N-carbobenzoxyl-L-leuciny-L-leuciny-L-leucinal (zLLL; auch als MG132 bezeichnet) sowie das wirksamere Borsäure-Derivat MG232. zLLL und davon abgeleitete Derivate. Sie blockieren das Proteasom reversibel durch Ausbildung einer transienten Hemiacetal-Struktur mit der katalytisch 25 aktiven Threonin-Hydroxyl-Seitenkette in Position 1 der β -Untereinheit des 26S Proteasoms. Ähnlich zu zLLL wurde eine weitere Klasse von modifizierten Peptiden, die Peptid-Vinyl-Sulfone, als Proteasom-Inhibitoren beschrieben (für Review siehe Elliott und Ross, 2001).

[0011] Natürlich vorkommende Substanzen sind Lactacystin (LC) (Fenteany et al., 1995), das aus Streptomyceten, sowie Epoxomycin, das aus Aktinomyzeten gewonnen wird (Meng et al., 30 1999a,b). LC ist ein hoch spezifischer, irreversibel wirkender Proteasom-Inhibitor, welcher hauptsächlich die Chymotrypsin und die Trypsin-ähnlichen Aktivitäten des 26S Proteasom-Partikels blockiert (Fenteany et al., 1995). LC hat keine Peptid-Grundstruktur, sondern besteht aus einem γ -Lactam-Ring, einem Cystein und einer Hydroxy-butyl-Gruppe. LC selbst inhibiert nicht das Proteasom. Vielmehr wird in wässriger Lösung der N-Acetyl-Cystein-Rest 35 hydrolysiert. Das Resultat ist die Bildung eines Clastolactacystein β -Lactons, das in der Lage ist, Zellmembranen zu penetrieren. Nach Zellaufnahme kommt es zum nukleophilen Angriff

des β -Lacton-Rings und anschließender Transesterifizierung der Threonin1-Hydroxyl-Gruppe der β -Untereinheit (Fenteany et al., 1995). Hinsichtlich Spezifität und Wirksamkeit ist Epoxomicin der bislang wirksamste aller bekannten natürlichen Proteasom-Inhibitoren (Meng et al., 1999;a, b).

- 5 [0012] Eine weitere und sehr potente Klasse an synthetischen Proteasom-Inhibitoren sind Borsäure-Peptid-Derivate, insbesondere die Verbindung Pyranozyl-Phenyl-Leuzinyl-Borsäure mit dem Namen "PS-341". PS-341 ist unter physiologischen Bedingungen sehr stabil und nach intravenöser Applikation bioverfügbar (Adams und Stein, 1996; Adams et al., 1999, US 1448.012TW01). Die besondere Wirksamkeit von PS-341 als Proteasom-Inhibitor wird ver-
- 10 mutlich durch die sehr stabile Bindung zwischen Borsäure- und Hydroxyl-Gruppe der katalytisch aktiven Seitenkette von Thr1 in der aktiven β -Untereinheit des 20S-Proteasoms ($K_i = 0.6$ nM) realisiert (Adams und Stein, 1996). Außer dem Proteasom ist bislang keine zelluläre Protease bekannt, welche durch PS-341 beeinflusst wird. Verschiedene Borsäure-Peptid-Derivate wurde auf Wirkung als Proteasom-Inhibitor bereits getestet (Adams et al., 1998).
- 15 Dabei wurde festgestellt, dass Leucin, bevorzugt in P1-Position, sowie relativ große hydrophobe Seitenketten (zum Beispiel Naphthylalanin) in P2 und P3 die Wirksamkeit und den K_i -Wert (inhibitorische Konstante) des Inhibitors verbessern (Adams et al., 1998).

1.2.1. Klinische Applikation von Proteasom-Inhibitoren

- 20 [0013] Die Hemmung der Proteasom-Aktivität als hauptsächliche zelluläre Protease kann zu Veränderungen in der Regulation des Zellzyklus, der Transkription, der gesamten zellulären Proteolyse, sowie der MHC-I Antigenprozessierung führen (für Review siehe Ciechanover et al., 2000). Demzufolge ist eine dauerhafte Inhibierung aller enzymatischen Aktivitäten des Proteasoms mit dem Leben einer Zelle und somit des Gesamtorganismus nicht vereinbar. Be-
- 25 stimmte, reversibel wirkende Proteasom-Inhibitoren können jedoch selektiv einzelne proteolytische Aktivitäten des 26S Proteasoms inhibieren, ohne dabei andere zellulären Proteasen zu beeinflussen. Die Zytotoxizität solcher Inhibitoren ist daher wesentlich geringer im Vergleich zu relativ unspezifisch wirkenden Peptidaldehyden wie zLLL. Erste klinische Studien mit Proteasom-Inhibitoren (Adams et al., 1999) verdeutlichen, dass diese Substanzklasse ein e-
- 30 normes Potential als Pharmaka mit einer vielfältiger Anwendungsbasis hat (für Review siehe Elliot und Ross, 2001).

- [0014] Die Bedeutung von Proteasom-Inhibitoren als neues therapeutisches Prinzip hat in den vergangenen Jahren zunehmende Aufmerksamkeit erfahren, insbesondere bei der Behandlung von Krebs und entzündlichen Erkrankungen (für Review siehe Elliot und Ross, 2001). Bis-
- 35 lang ist der Einsatz für die breite klinische Anwendung am Menschen noch nicht zugelassen, die pharmazeutische Industrie arbeitet aber intensiv an der Entwicklung von neuen Medikamenten auf der Basis von in vivo-verträglichen Proteasom-Inhibitoren. Die Firma "Millenni-

um *Inc.*" (Cambridge, MA, USA) entwickelte Proteasom-Inhibitoren für entzündungshemmende, immunmodulatorische und antineoplastische Therapien, insbesondere Borsäure-Derivate von Di-Peptiden, und dabei insbesondere die Verbindung PS-341 (Adams et al., 1999). Die orale Applikation von PS-341 hat im Ratten-Modell eine entzündungshemmende Wirkung in Streptokokken-induzierter Polyarthritits und Leber-Entzündung (Palombella et al., 1998). Im Maus-Modell zeigt PS-341 anti-neoplastische Wirkung bei Lungenkarzinomen und hat außerdem additive Wirkung in Verbindung mit Zytostatika (Teicher et al., 1999). In vitro-Versuche demonstrierten eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber soliden humanen Ovarien- und Prostata-Tumorzellen (Frankel et al., 2000). PS-341 ist der bislang einzige klinisch erprobte Proteasom-Inhibitor. Phase I Studien an PS-341 demonstrierten eine gute Bio-Verfügbarkeit und pharmakokinetisches Verhalten (Lightcap et al., 2000). Phase I- und Phase II-klinische Studien in Patienten mit unterschiedlichen Krebserkrankungen, wie zum Beispiel hämatologischen Malignancies als soliden Tumoren, wurden bereits abgeschlossen. Neben überraschenden therapeutischen Effekten in verschiedenen Tumor-Patienten ist bemerkenswert, dass keine Dosis-limitierende Toxizität bei der Behandlung mit PS-341 beobachtet werden konnte. Die Informationen dazu wurden in Pressemitteilungen von Millennium *Inc.* vorgestellt. (publiziert unter

<http://biz.yahoo.com/prnews/010301/neth003.html>;

<http://biz.yahoo.com/prnews/010301/neth003.html>;

http://www.mlnm.com/releases.pr052300_1.shtml;

<http://www.cancernet.nci.nih.gov/>;

<http://www3.manderson.org/leukemia/insight/letter52.html>.

[0015] Eine weitere klinische Anwendung von Proteasom-Inhibitoren, insbesondere solche, die von der Firma Millennium *Inc.* entwickelt wurden, deutet sich bei entzündlichen und Auto-Immunerkrankungen an. Diese werden allgemein ausgelöst durch eine Kaskade der Zytokin- und Chemokin-Produktion sowie der Expression von bestimmten Zelladhäsionsmolekülen. Eine zentrale Stellung nimmt hierbei der Transkriptionsfaktor NF- κ B ein. Dieser ist notwendig für die Expression einer Reihe von pro-inflammatorischen Faktoren. NF- κ B, als ein Vertreter der Rel-Proteine besteht aus einem Heterodimer von p50 und p65 (RelA) Untereinheiten (für Review siehe Baldwin, 1996). In ruhenden Zellen garantiert die Bindung des inhibitorischen Faktors I κ B an NF- κ B über Maskierung des nukleäres Lokalisationssignal des p50/p65 Heterodimers die Lokalisation von NF- κ B im Zytosol und zwar in einer latenten, inaktiven Form. Signale der Zellaktivierung, zum Beispiel Zytokine oder virale Infektionen lösen die Phosphorylierung und poly-Ubiquitynylierung von I κ B und damit die Aktivierung von NF- κ B aus. Nach Aktivierung transloziert NF- κ B in den Zellkern und stimuliert die

Transkription von verschiedenen Genen, vor allem von Zytokinen, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen. Diese Faktoren sind in der Summe involviert in der Regulation von immunologischen und inflammatorischen Prozessen. Durch Proteasom-Inhibitoren kann der Abbau von I κ B und somit die Aktivierung von NF- κ B blockiert werden (Palombella et al., 1994).

5 [0016] In einem Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass der Proteasom-Inhibitor PS-519 (ein β -Lacton-Derivat) eine starke anti-inflammatorische Wirkung ausübt. In niedrigen Dosen ist PS-519 auch wirksam in Kombination mit Steroiden. PS-519 wurde daher als neues Medikament für die Asthma-Behandlung vorgeschlagen (Elliot et al., 1999). Eine weitere Anwendung für PS-519 ergibt sich im Infarkt-Modell: Die inflammatorische Reaktion nach cerebralen Verletzungen wurde durch PS-519 dramatisch reduziert. Danach scheint PS-519 ebenfalls ein interessantes Pharmakon für die Behandlung von Gehirnschlag zu sein (Phillips et al., 2000).

[0017] Da Proteasom-Inhibitoren einen essentiellen Pathway im Zellmetabolismus treffen, ist ein strenges Dosis-Regime notwendig, um toxische Neben-Effekte zu unterdrücken. Im Rahmen der Entwicklung von in vivo verträglichen Proteasom-Inhibitoren wurden verschiedene Peptid-Borsäure-Derivate getestet, welche sowohl in der Zellkultur als auch im Tiermodell anti-Tumor-Wirkung zeigten (Adams et al., 1996; 1998; 1999). In vitro besitzt PS-341 eine selektive zytotoxische Aktivität gegen ein breites Spektrum an humanen Tumorzelllinien (Adams et al., 1999). Diese Aktivität ist mit der Akkumulation von p21 und Zellzyklus-Arrest in der G2-M-Phase mit nachfolgender Apoptose verbunden (Adams et al., 1999). Direkte Injektion von PS-341 bewirkte im Maus-Modell das Absterben von 70% der untersuchten Tumoren. Nach intravenöser Verabreichung von PS-341 verteilte sich die Substanz in allen Organen und Geweben und hatte anti-neoplastische Aktivität in human-Xenograft-Modellen (Adams et al., 1999). Toxikologische Studien zu PS-341 in Primaten erbrachten dosisabhängige Nebenwirkungen vor allem im gastrointestinalen Bereich, wo PS-341 nach intravenöser Applikation die höchste Verteilung zeigte (Adams et al., 1999). Ein weiterer Nachteil von PS-341 und verwandten Inhibitoren ist, dass sie nicht die Blut-Hirnschranke überwinden und somit nicht im Zentralnervensystem wirksam werden können (Adams et al., 1999).

[0018] Der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren mit dem Ziel, virale Infektionen zu blockieren, wurde bereits beschrieben. Insbesondere wurde von Schubert et al. (2000 a, b) gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren die Assemblierung, Freisetzung und proteolytische Reifung von HIV-1 und HIV-2 blockieren. Dieser Effekt beruht auf einer spezifischen Blockade der proteolytischen Prozessierung der Gag-Polypoteine durch die HIV-Protease, ohne dass Proteasom-Inhibitoren die enzymatische Aktivität der viralen Protease selbst beeinflussen. Der Mechanismus, mit welchem Proteasomen die Assemblierung verschiedener Viren regulieren, ist bislang unverstanden. Weitere Zusammenhänge mit dem UPS wurden für Budding von Rous Sarcoma Virus, RSV (Patnaik et al., 2000); Simian Immunodeficiency

Virus, SIV (Strack et al., 2000), und Ebola Virus (Harty et al., 2000) berichtet. Im letzteren Fall (Harty et al., 2000) wurde gezeigt, dass eine zelluläre Ubiquitinligase mit Ebola-Matrixprotein in Wechselwirkung tritt, eine direkte Bedeutung der Proteasom-Aktivität für die Replikation von Ebola oder verwandten Viren sowie die Inhibierung der Assemblierung von Ebola-Viren wurde bislang nicht gezeigt.

[0019] Ein wesentlicher Teil der Erfindung besteht also darin, dass die überraschenderweise festgestellte anti-virale Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf Mitglieder der *Flaviviridae* Familie, speziell auf mit dem HCV nächst-verwandte Viren wie Pestiviren, bislang nicht beschrieben wurde. Insbesondere wurden keinerlei anti-virale Effekte durch Proteasom-Inhibitoren beschrieben, die den Eintritts-/Internalisierungsprozess oder das Uncoating (Freisetzen des Virus-core) des *Flaviviridae*-Viruspartikels betreffen. Ebenso wenig wurden anti-virale Effekte durch Proteasom-Inhibitoren beschrieben, die die Assemblierung, Maturierung oder die Sekretion von Nachkommenviren von *Flaviviridae* betreffen. Es wurde nicht beschrieben, dass Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung von infektiösen *Flaviviridae*-Virionen der Virus-Produzent-Zellen blockieren. Weiterhin wurde nicht berichtet, dass Proteasom-Inhibitoren im Vergleich zu primären Hepatozyten bevorzugt Hepatomazellen abtöten und dadurch für die Therapie von Leberkarzinomen geeignet sind. Die erfindungsgemäß dargestellten Wirkungen von Proteasom-Inhibitoren auf frühe und/oder späte Prozesse des *Flaviviridae*-Lebenszyklus, wie auch auf Hepatomazellen, stellen somit völlig neuartige Prinzipien der anti-viralen Behandlung von Infektionen dieser Viren, speziell von HCV-Infektionen, dar.

1.3. Verbindung zwischen dem UPS und dem Lebenszyklus von *Flaviviridae*, speziell HCV

[0020] In keiner bekannten Studie wurde bisher analysiert, welchen Einfluss Proteasom-Inhibitoren auf die Freisetzung und Infektiosität von Mitgliedern der *Flaviviridae*-Familie haben, wie dies in der vorliegenden Erfindungsbeschreibung beobachtet und dargestellt wird. Publiziert wurde bisher, dass die Expression von HCV-Proteinen die Aktivität des UPS nicht beeinflusst (Moradpour et al., 2001). Darüber hinaus ist bekannt, dass eine Fraktion des HCV-Core-Proteins über das UPS abgebaut wird (Suzuki et al., 2001). Es tritt auch eine mono-ubiquitinierte Form des Core-Proteins auf, die jedoch stabil ist und nicht abgebaut wird. Bisher wurde nicht getestet, ob Proteasom-Inhibitoren einen Einfluss auf die Proliferation oder den Transformationstatus von hepatozelluläre Karzinomen (HCC) haben. Bekannt ist lediglich, dass die P28 Proteasom-Untereinheit in den meisten HCCs überexprimiert wird (Higashitsuji et al., 2000).

2. Biologie der *Flaviviridae*

[0021] Die Familie *Flaviviridae* umfasst die Genera *Flavivirus*, *Pestivirus* und *Hepacivirus* (Hepatitis-C-Virus, HCV). Neben diesen drei Genera wurde kürzlich eine Gruppe weiterer *Flaviviridae*-ähnlicher Viren, die GB-Viren, charakterisiert, die bisher nicht klassifiziert sind.

5 Die phylogenetische Verwandtschaft ist zwischen Pestiviren und HCV erheblich ausgeprägter als zwischen Flavi- und Pesti- bzw. HCV und Flaviviren. Dementsprechend sind die Morphologie des Virions, die Genomorganisation und die bekannten biochemischen Mechanismen der Genexpression und Genomreplikation zwischen Pestiviren und HCV besonders konserviert. Wie bereits ausgeführt, handelt es sich bei vielen Mitgliedern der
10 *Flaviviridae* um bedeutende Human- und Tierpathogene (für Review siehe Lindenbach and Rice, 2001).

2.1. Aufbau des Virions; Mechanismus des Virus-Eintritts in die Wirtszelle

[0022] Das Virusgenom der *Flaviviridae* ist eine einzelsträngige, nicht segmentierte RNA
15 positiver Orientierung mit einer Länge von 10 (HCV), 11 (Flaviviren) bzw. 13 Kilobasen (Pestiviren). Im Virion ist das RNA-Genom mit Kapsid(C, oder "Core")- Proteinen komplexiert. Dieser Nukleoprotein-Komplex wird von einer Lipid-Doppelmembran umhüllt, in die zwei oder drei Spezies von Hüll(E, oder "Envelope")-Proteinen eingelagert sind. Es wird vermutet, dass Bindung des Viruspartikels an die Zelle und Eintritt ("Entry") über eine
20 Rezeptor-medierte Endozytose erfolgt. Die Virus-Hüllproteine assoziieren dabei mit einem zellulären Rezeptor: Verschiedene experimentelle Daten weisen bei HCV auf eine Interaktion des Envelope-Proteins E2 mit CD81 und/oder dem low density lipoprotein(LDL)-Rezeptor (für Review siehe Lindenbach and Rice, 2001). Bei BVDV wurde eine Interaktion mit CD 46 und dem LDL-Rezeptor festgestellt (Müller et al. 2000; Agnello et al., 2000). Durch Fusion
25 der Virushülle mit der Membran, katalysiert durch niedrigen pH, kommt es zur Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytoplasma. Ein unbekannter Mechanismus führt zur Dissoziation der viralen Kapsidproteine und zur Freisetzung (Uncoating – Freisetzung, Entmantelung des Virus-core) des Genoms (für Review siehe Lindenbach and Rice, 2001).

2.2. Genexpression der *Flaviviridae*

[0023] Die virale RNA umfasst ein einziges translationales Leseraster ("open reading frame"; ORF), das am 5'- und am 3'-Ende von nicht-translatierten Regionen (UTRs) umrahmt wird. Die Translation führt zur Synthese eines instabilen Polyproteins, das ko- und posttranslational in virale Polypeptide gespalten wird.

35 [0024] Entsprechend der Ähnlichkeiten der Genomstruktur sind bei den Mitgliedern der *Flaviviridae* auch die Vorgänge, die zur Prozessierung des Polyproteins führen, weitgehend konserviert. Dies gilt insbesondere für Pestiviren und HCV. Der aminoterminal Bereich des Po-

lyproteins enthält die Polypeptidsequenzen für die strukturellen Komponenten des Virions, das heißt für das Kapsid-Protein, C, sowie für mindestens zwei virale Envelope-Proteine (Flaviviren: prM, E, NS1; Pestiviren: E^{ms}, E1, E2; HCV: E1, E2). Die Strukturproteine werden in erster Linie von Signalpeptidasen der Wirtszelle aus dem Polyprotein generiert. Die Envelope-Proteine, die stark glykosiliert werden, assoziieren zu Homo- und Heterodimeren: Bei Pestiviren und HCV sind E2-E2- und E2-E1-Dimere dokumentiert. Die Funktion des löslichen pestiviralen Envelope-Proteins E^{ms} ist bisher unklar: Es besitzt eine Ribonuklease-Funktion und wird für die Infektion in Zellkultur nicht benötigt. Die Dimerisierung spielt beim Virus-Entry eine wichtige Rolle (für Review, siehe Lindenbach and Rice, 2001). Die Prozessierung des C-terminalen Nicht-Struktur(NS)-Polyproteins NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 (bei Flaviviren) bzw. NS2-NS3 (bei Pestiviren NS2-3) - NS4A-NS4B-NS5A-NS5B (bei Pestiviren und bei HCV), wird bei allen drei Genera vorwiegend durch einen viralen Proteasekomplex katalysiert. Dieser besteht aus einer Serinprotease, die sich im aminoterminalen Bereich des NS3-Proteins befindet und einem Kofaktor (NS2B bei Flaviviren, NS4A bei Pestiviren und HCV). Bei Flaviviren generiert der NS3-NS2B-Komplex alle NS-Proteine, lediglich die Proteolyse zwischen NS4A-NS4B wird durch eine zelluläre Signalseaktivität katalysiert. Bei Pestiviren und HCV spaltet NS3-4A das komplette NS-Polyprotein mit Ausnahme von NS2-NS3. Letztere Spaltung erfolgt bei HCV durch eine Autoprotease katalysiert, die an dieser Stelle lokalisiert ist (für Review, siehe Lindenbach and Rice, 2001). Beim Pestivirus BVDV ist das Ausmaß der proteolytischen Spaltung zwischen NS2 und NS3 interessanterweise mit einem zytopathischen Effekt der Virusinfektion verknüpft.

[0025] Weiterhin wurde gezeigt dass es sich bei NS5 (bei Flaviviren) bzw. NS5B (Pestiviren, HCV) um die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) handelt. Die Funktionen von NS4B und NS5A sind bislang ungeklärt.

2.3. Genomreplikation der *Flaviviridae*

[0026] Entsprechend dem allgemeinen Replikations-Modell von Positiv-Strang RNA-Viren assoziiert im Zytoplasma der von *Flaviviridae* infizierten Wirtszelle in direkter funktioneller Kopplung an Translation und Proteolyse des Polyproteins ein funktioneller membrangebundener Replikationskomplex, der aus der viralen RNA sowie viralen und zellulären Faktoren besteht. Dieser Komplex katalysiert zunächst die Synthese einer geringen Anzahl komplementärer Minus-Strang RNA-Molekülen; diese dienen dann in einem zweiten Schritt als Matrize für die Synthese eines signifikanten Überschusses neuer Plus-Strang RNA-Genome.

[0027] In den vergangenen Jahren ist der RNA-Replikationsprozess besonders bei Pestiviren intensiv untersucht worden. Maßgebliche Gründe hierfür waren das bereits erwähnte Fehlen eines infizierbaren Zellkultursystems für HCV und der Modellcharakter von Pestiviren für HCV. Basierend auf Daten mit BVDV konnte kürzlich auch ein effizientes Replikations-

system für das HCV etabliert werden (Lohmann et al. 1999). Für Pestiviren stehen bereits seit geraumer Zeit infizierbare Zellen in Kultur zur Verfügung. Zudem wurden 1996 "infektiöse cDNA Konstrukte" für BVDV und CSFV konstruiert, von denen aus sich durch *in vitro*-Transkription komplette virale RNA-Genommoleküle gewinnen lassen. Nach Transfektion in Wirtszellen sind diese RNA-Moleküle in der Lage, den kompletten pestiviralen Lebenszyklus bis hin zur Synthese neuer Viruspartikel zu durchlaufen (Moormann et al., 1996; Meyers et al., 1996). Durch Mutagenese der cDNA können Mutationen gezielt in die viralen RNA-Transkripte eingeführt werden und deren Effekt auf den viralen Lebenszyklus bestimmt werden ("reverse Genetik").

[0028] Die identische Organisation von Pestivirus und HCV-Replikons ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass die generellen molekularen Mechanismen, die der viralen RNA-Replikation unterliegen, zwischen beiden Genera konserviert sind. Im Falle von HCV ist es aber weder mit Virusisolaten aus Patienten noch mit *in vitro*-transkribierter kompletter genomischer RNA (Pietschmann et al., 2002) gelungen, den viralen Lebenszyklus in Zellkultur zu reproduzieren. Bei Untersuchungen, die den Eintritt des Virus in die Zelle, das Uncoating des Genoms sowie die Maturierung und Sekretion von Nachkommenviren betreffen, ist man also dringend auf das Pestivirus-Modell angewiesen.

2.4. Virion-Assembly und Sekretion von Nachkommenviren

[0029] Die späten Schritte des viralen Lebenszyklus sind bei allen drei *Flaviviridae* Genera kaum untersucht. Man nimmt an, dass ein Anteil der neu synthetisierten Positiv-Strang RNA-Moleküle in "statu nascendi" mit Kapsid-Proteinen zu Nukleokapsid-Partikeln assoziiert. Diese gelangen durch Knospung (engl: Budding) in zytoplasmatische Vesikel des endoplasmatischen Retikulums. Da die Envelope-Proteine bei der Maturierung in der ER-Membran verbleiben, entstehen auf diese Weise die umhüllten Virionen, die die Envelope-Proteine in korrekter Orientierung enthalten. Die Vesikel fusionieren im Zuge der zellulären Sekretion mit der Plasmamembran, wodurch die Viruspartikel in das extrazelluläre Kompartiment freigesetzt werden (Lindenbach and Rice, 2001).

2.5. Das Problem der Heterogenität

[0030] Während der Vermehrung von *Flaviviridae* entstehen häufig Mutationen. Deshalb sind die entsprechenden Wirtsorganismen stets mit einer sehr heterogenen Population dieser Viren infiziert. Die Heterogenität beeinflusst die Pathogenese, die Virusresistenz, das Ansprechen auf die Therapie mit Interferonen (IFN) und antiviralen Substanzen (Nukleosidanaloge und andere) sowie die Erkennung infizierter Zellen durch das Immunsystem. Diese Tatsache untermauert, dass neue antivirale Strategien notwendig und sinnvoll sind.

2.6. Möglichkeiten der Therapie einer chronischen HCV-Infektion

[0031] Eine der wenigen Therapiemöglichkeiten einer chronischen HCV-Infektion ist die Behandlung mit Interferon (IFN) alpha und Derivaten. Wesentlicher Nachteil von IFN-Therapien ist, dass diese häufig mit negativen Nebenwirkungen assoziiert sind. Seit 1999 ist für die Therapie der chronischen HCV das Guanosinanalogen Ribavirin in Kombination mit Interferonen zugelassen. Die Wirkungsweise dieses Medikaments ist jedoch nur unvollständig geklärt. Ribavirin hat außerdem häufig eine Reihe von Nebenwirkungen, wobei die Ribavirin-induzierte Hämolyse von besonderer Bedeutung ist. Neben Ribavirin werden weitere Nucleosidanaloga sowie eine Reihe von Substanzen unbekannter Wirkweise verwendet (für Review siehe Trautwein und Manns, 2001). Für alle gegenwärtig zugelassenen Medikamente gegen HCV-Infektion gilt, dass es eine hohe Zahl von Nonrespondern gibt (in der Regel etwa 30-40%). Die Erfolgsrate ist noch geringer bei Koinfektionen verschiedener Viren (z.B. dem humanen Immundefizienzvirus HIV und HCV oder HBV und HCV). Selbst bei klinisch erfolgreicher Behandlung werden alle viralen Reservoirs nur selten komplett eliminiert und können zu einer Reaktivierung der Infektion führen (Rehermann et al., 1996). Bei fehlendem Ansprechen auf die Therapie oder gar einer Reaktivierung der Virusreplikation können grundsätzlich nur neue Medikamente helfen, wie sie in dieser Erfindung beschrieben werden. Die Risiken des Einsatzes aller bisher eingesetzten antiviralen Medikamente sind noch nicht mit Sicherheit zu beurteilen. Nukleosidanaloga wie Ribavirin bergen prinzipiell die Gefahr, dass resistente Viren entstehen und dass es zu Mutationen im Wirtsgenom kommt, die Anlass zur Entstehung von Krebs geben könnten. Die im Rahmen der hier vorgestellte Erfindung genannten neuen Medikamente sind nicht mit diesen Risiken behaftet bzw., diese sind sehr viel unwahrscheinlicher oder nicht zu erwarten.

[0032] Folgende Patentschriften, welche die vorliegende Erfindung nicht unmittelbar betreffen, wurden veröffentlicht: ein Verfahren zur Bestimmung der Proteasom-Aktivität in biologischen Proben (WO 00/23614); die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren als Mittel zur Behandlung von Krebs, Entzündungen und Autoimmunerkrankungen (WO 99/22729); die Verwendung von Inhibitoren des UPS als Mittel zur Behandlung von Entzündungen und Autoimmunerkrankungen (WO 99/15183).

Wesen der Erfindung

[0033] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Mittel zur Hemmung der Freisetzung und der Infektiosität von Mitgliedern der *Flaviviridae*, insbesondere von Hepatitis-C-Viren zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe wurde durch den Einsatz von mindestens einem Proteasom-Inhibitor in einer pharmazeutischen Zubereitung gelöst. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, welche die Aktivitäten des zellulären Proteasom-Pathway hemmen, regulieren oder

welche die Aktivitäten des zellulären Proteasom-Pathway hemmen, regulieren oder anderweitig beeinflussen. Es ist auch möglich, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die speziell die enzymatischen Aktivitäten des kompletten 26S Proteasom-Komplexes und der freien, nicht mit regulatorischen Untereinheiten assemblierten 20S katalytisch aktiven Proteasom-Struktur beeinflussen. Diese Inhibitoren können entweder eine oder mehrere oder alle der drei hauptsächlich proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms (die Trypsin-, die Chymotrypsin- und die Postglutamyl-Peptid hydrolysierenden Aktivitäten) innerhalb des 26S- oder auch des 20S-Proteasom-Komplexes hemmen.

[0034] Eine Variante der Erfindung besteht darin, als Proteasom-Inhibitoren Substanzen einzusetzen, die von Zellen höherer Eukaryoten aufgenommen werden und nach Zellaufnahme mit der katalytischen beta-Untereinheit des 26S-Proteasoms in Wechselwirkung treten und dabei alle oder einzelne der proteolytischen Aktivitäten des Proteasom-Komplexes irreversibel oder reversibel blockieren.

[0035] Als eine weitere Form der Erfindung kommen Mittel zum Einsatz, welche die Aktivitäten der Ubiquitin-konjugierenden wie auch der Ubiquitin-hydrolysierenden Enzyme hemmen. Polyubiquitinierung gilt allgemein als ein Erkennungssignal für die Proteolyse durch das 26S-Proteasom, und Beeinflussung des Ubiquitin-Pathway kann ebenfalls die Aktivität des Proteasoms regulieren.

[0036] Erfindungsgemäß werden als Proteasom-Inhibitoren auch Substanzen eingesetzt, die in verschiedenen Formen *in vivo* oral, intravenös, intramuskulär, subkutan, in verkapselter Form mit oder ohne Zell-Spezifität-tragende Veränderungen oder anderweitig verabreicht werden, aufgrund der Anwendung eines bestimmten Applikations- und Dosis-Regimes eine geringe Zytotoxizität und/oder hohe Selektivität für bestimmte Zellen und Organe aufweisen, keine oder unbedeutende Nebenwirkungen auslösen, eine relativ hohe metabolische Halbwertszeit und eine relativ geringe Ausscheidungs(Clearance)-Rate im Organismus aufweisen.

[0037] Als Proteasom-Inhibitoren werden des weiteren Substanzen eingesetzt, die in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden, durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen oder total-synthetisch hergestellt werden. Dazu gehören:

a) natürlich vorkommende Proteasom-Inhibitoren:

- Epoxomicin und Eponemycin,
- Aclacinomycin A (auch bezeichnet als Aclarubicin),
- Lactacystin und dessen chemisch modifizierte Varianten, insbesondere die Zellmembranpenetrierende Variante "Clastolactacystein β -Lacton",

b) synthetisch hergestellte:

- modifizierte Peptidaldehyde wie zum Beispiel N-carbobenzoxy-L-leuciny-L-leuciny-L-leucinal (auch bezeichnet als MG132 oder zLLL), dessen Borsäure-Derivat MG232; N-

carbobenzoxy-Leu-Leu-Nva-H (bezeichnet als MG115); N-Acetyl-L-Leuzinyl-L-Leuzinyl-L-Norleuzinal (bezeichnet als LLnL); N-carobenzoxy-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H (auch bezeichnet als PSI);

- Peptide, die C-terminal α,β -Epoxyketone (auch bezeichnet als Epoxomicin oder Eponemycin), Vinyl-sulphone (zum Beispiel Carbobenzoxy-L-Leucinyl-L-Leucinyl-L-Leucin-vinyl-sulfon oder 4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylactetyl-L-Leucinyl-L-Leucinyl-L-Leucin-vinyl-sulfon, auch bezeichnet als NLVS), Glyoxal oder Borsäure-Reste (zum Beispiel Pyrazyl-CONH(CHPhe)CONH(CHisobutyl)B(OH)₂), auch bezeichnet als "PS-431" oder Benzoyl(Bz)-Phe-boroLeu, Phenacetyl-Leu-Leu-boroLeu, Cbz-Phe-boroLeu);
- Pinacol-Ester - zum Beispiel Benzyloxycarbonyl (Cbz)-Leu-Leu-boroLeu-Pinacol-Ester -

und

- als besonders geeignete Verbindungen werden Peptide und Peptid-Derivate eingesetzt, welche C-terminal Epoxyketon-Strukturen tragen, hierzu zählen beispielsweise Epoxomicin (Molekülformel: C₂₈H₈₆N₄O₇) und Eponemycin (Molekülformel: C₂₀H₃₆N₂O₅);
- chemisch modifizierte Derivate auf der Basis von natürlich vorkommenden, insbesondere ein β -Lacton-Derivat mit der Bezeichnung PS-519 (1R-[1S, 4R, 5S]]-1-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-propyl-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptane-3,7-dione, Molekülformel: C₁₂H₁₉NO₄), welches sich von dem natürlichen Proteasom-Inhibitor Lactacystin ableitet;
- bestimmte Dipeptidyl Borsäure-Derivate, insbesondere Verbindungen, welche sich von dem Pyranozyl-Phenyl-Leuzinyl-Borsäure-Derivat mit dem Namen "PS-341" (N-Pyrazinecarbonyl-L-Phenylalanin-L-leuzin-Borsäure, Molekülformel: C₁₉H₂₅BN₄O₄) ableiten. Hierzu zählen weiterhin die Verbindungen "PS-273" (Morpholin-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und dessen Enantiomer PS-293, die Verbindung PS-296 (8-Quinolyl-sulfonyl-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-303 (NH₂(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-321 (Morpholin-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-Phenylalanin)-B(OH)₂); die Verbindung PS-334 (CH₃-NH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-Isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-325 (2-Quinol-CONH-(CH-homo-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-352 (Phenylalanin-CH₂-CH₂-CONH-(CH-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-383 (Pyridyl-CONH-(CHpF-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂). Alle diese Verbindungen wurden bereits beschrieben, unter anderem in Adams et al. (1999).

[0038] Als besonders geeignete Verbindungen haben sich, neben Epoxomicin und Eponemycin, die Proteasom-Inhibitoren PS-519, PS-341 und PS-273 (Millennium Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA 02139, USA) erwiesen. Diese Proteasom-Inhibitoren sind sehr potent,

sehr spezifisch für das Proteasom, blockieren keine anderen zelluläre Proteasen und haben daher so gut wie keine Nebenwirkungen. Die Proteasom-Inhibitoren PS-341 und PS-519 wurden außerdem sowohl in Tiermodellen für vorklinische als auch in Menschen (Krebspatienten) für klinische Studien getestet.

5 [0039] Die erfindungsgemäß eingesetzten Mittel sind dadurch gekennzeichnet, dass sie sich zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Hepatitis-C-Virus (HCV), zur Behandlung und Prophylaxe von HCV-bedingten Hepatitiden, Flavivirus-bedingtem Fieber, von Hämorrhagien, Leukopenie, Thrombozytopenie, von Durchfallerkrankungen, Encephali-
10 tiden sowie von Pestivirus-verursachten Krankheiten eignen.

[0040] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird überraschenderweise festgestellt, dass Proteasom-Inhibitoren frühe oder späte Prozesse im Lebenszyklus des BVDV Pestivirus und des West-Nil-Flavivirus hemmen. Die intrazelluläre Replikation von BVDV- und HCV-RNA-
15 Replikons wird dagegen von den Proteasom-Inhibitoren nicht oder kaum beeinflusst. Spezi- fisch wurde beobachtet, dass sich die erfindungsgemäße Verwendung von Proteasom- Inhibitoren dazu eignet, die Produktion von infektiösen Virionen in mit BVDV- und West- Nil-infizierten Zellen weitgehend oder vollkommen zu unterbinden. Nach Behandlung von BVDV- und West-Nil-Virus-produzierenden Zellen mit Proteasom-Inhibitor tritt eine nahezu
20 vollständige Reduktion der Infektiosität der freigesetzten Virionen ein. In Folge dieser neuar- tigen Aktivitäten können Proteasom-Inhibitoren bei verschiedenen Mitgliedern der *Flaviviri- dae*-Familie die Neuinfektion von Wirtszellen und damit die Ausbreitung einer Infektion *in vivo* unterdrücken.

[0041] Als weiterer wichtiger Punkt der Erfindungsbeschreibung, der vor allem im Zusam-
25 menhang mit HCV-Infektionen von Bedeutung ist, wurde festgestellt, dass die Behandlung von Hepatomazellen mit Proteasom-Inhibitoren bevorzugt das Absterben dieser Krebszellen induziert, während gesunde, primäre Hepatozyten und andere, nicht proliferierende Leberzel- len sehr viel resistenter gegenüber einer Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren sind. Leber- karzinome sind medikamentös kaum behandelbar und führen in der Regel ohne Lebertrans-
30 plantation oder Leberresektion zum Tod. Proteasom-Inhibitoren erlangen dadurch ein weite- res therapeutisches Potential für die Behandlung von Hepatitis-C-Virusinfektionen: Durch die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren kann nicht nur die Ausbreitung der Infektion (durch Blockierung der Produktion infektiöser Virionen), sondern auch die mit der Infektion verbun- dene Entstehung von Leberzell-Karzinomen unterdrückt, verhindert oder ein bereits etablier-
35 tes Leberzellkarzinom geheilt werden. Dieser Anspruch beruht auf der Tatsache, dass die Be- handlung mit Proteasom-Inhibitoren - ähnlich der bereits bekannten anti-neoplastischen Wir- kung von Proteasom-Inhibitoren auf eine Vielzahl von Tumoren - eine spezifische Eliminie-

5 rung von Leberkarzinomzellen *in vivo* bewirken kann. Die anti-neoplastische Wirkung von Proteasom-Inhibitoren wurde bislang nicht für Leberzellkarzinome gezeigt und stellt daher ein neuartiges therapeutisches Prinzip dar. Proteasom-Inhibitoren können somit zur Behandlung/Bekämpfung/Verhinderung von HCV-induzierter Leberzirrhose, insbesondere primären Leberzellkarzinomen eingesetzt werden.

10 [0042] Die Behandlung der Hepatitis C mit Proteasom-Inhibitoren ist wegen der weiten Verbreitung, der besonders hohen Pathogenität sowie wegen der Assoziation der chronischen Infektion mit der Entwicklung eines Leberkarzinoms von besonderer Bedeutung. Die Daten mit BVDV und West-Nil-Virus rechtfertigten ferner den Anspruch, dass Proteasom-Inhibitoren unter Verwendung der neuartigen anti-viralen Wirkung auch für die Behandlung anderer Hepatitis-Viren (A, B, D, E und F), GB-Viren sowie weiterer *Flaviviridae* wie zum Beispiel Dengue-Fieber-Virus oder Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) Virus eingesetzt werden können.

15 [0043] Die Proteasom-Inhibitoren können auch in Kombination mit anderen anti-Hepatitis-Medikamenten und sonstigen Therapieschemata eingesetzt werden, z.B. Interferon alpha/beta/gamma und Varianten hiervon (zum Beispiel pegylierte Interferone), Interleukine, Nukelosidanaloga (Lamivudine, Cidovir, Ribavirin und andere), Steroide, Plasma-Austausch, Thymosin alpha 1, Impfstoffe, passive und aktive Vakzinierung, therapeutische und prophylaktische Vakzinierung, Glycyrrhizin, Stammzell-transplantation, Organtransplantationen, 20 Nahrungstherapie, Immunsuppressiva, Cyclosporine und Derivate hiervon, Amanditin und Derivate, Interleukine und andere Cytokine, nicht Proteasom-selektive Protease-Inhibitoren, Azathioprin, Hämodialyse sowie hoch aktive antiretrovirale Therapie (highly active antiretroviral therapy, "HAART") bei Co-Infektionen von HCV und HIV. Da Proteasom-Inhibitoren auch anti-virale Wirkung auf HIV ausüben, ist eine Behandlung von HCV/HIV-Koinfektionen, insbesondere in Kombination mit HAART-Therapie, ein Anwendungsschwerpunkt der Erfindung. 25

[0044] Die erfindungsgemäße Verwendung von Proteasom-Inhibitoren besteht in der Hemmung des Entry/Internalisierung- und Uncoating-Prozesses von *Flaviviridae* sowie in der 30 Hemmung der Assemblierung, Reifung und Freisetzung von Nachkommenviren. Die Verwendung zur Hemmung der Vermehrung von *Flaviviridae* erfolgt nach den Mechanismen

- a) Blockierung/Reduktion der Assemblierung und Freisetzung von neuen Virionen
- b) Blockierung/Reduktion der Infektiosität der freigesetzten Virionen
- c) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in kultivierten Zellen.

35 [0045] Dies impliziert, dass Proteasomeninhibitoren die Ausbreitung von Nachkommenviren in infizierten Organen inhibieren.

[0046] Eine weitere Verwendung von Proteasom-Inhibitoren liegt in der Induktion des Absterbens von Hepato-Karzinomzellen, in der Unterdrückung und/oder Verhinderung des Entstehens von Leberzell-Karzinomen sowie in der Therapie von Patienten mit etablierten Leberzellkarzinomen.

- 5 [0047] Eine weitere Verwendung besteht in der Behandlung/Bekämpfung/Verhinderung von
- HCV-induzierter Leberzirrhose und/oder
 - HCV-induzierten Leberzellkarzinomen
 - Medikamenten-induzierten Leberkarzinomen
 - genetisch bedingten Leberkarzinomen und/oder
 - 10 - durch die Umwelt bedingten Leberkarzinomen.

[0048] Eine weitere Verwendung liegt in der gezielten Eliminierung von Leberkarzinomzellen, die infolge einer

- HCV-Infektion und/oder
 - HCV-HBV-Koinfektion
 - 15 - HCV-HBV-HDV-Koinfektionen
- entstehen.

[0049] Weiterhin finden Proteasom-Inhibitoren Verwendung zur

- Verhinderung der Entstehung, des Wachstums und der Metastasierung von Leberzelltumoren sowie zur bevorzugten Zerstörung von Leberkarzinomzellen in HCV-infizierten
- 20 Patienten
- Modulation der Expression, Modifizierung und Aktivität des Tumorsuppressor-Proteins p53 und andere HCC-relevanter Tumorsuppressorproteine
- Leberzellregeneration bei Patienten mit Leberentzündung
- Reduktion der Anzahl infizierter Virus-produzierender Zellen im Leberzellgewebe
- 25 - Hemmung sowohl der Erhaltung und Persistenz einer bereits etablierten Infektion als auch einer Sekundärinfektion und somit der Ausbreitung einer Infektion, einschließlich der Blockierung der Ausbreitung einer HCV-Infektion in vivo
- Behandlung von Koinfektionen mit HCV und Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2
- Behandlung von HCV/HIV-Koinfektionen in Kombination mit der HAART-Therapie
- 30 - Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei Leber- und anderen Organtransplantationen
- Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei Zelltherapien durch Gabe der Mittel vor, während und nach der Transplantation
- Behandlung und Bekämpfung von Hepatitiden in Kombination untereinander
- 35 - Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei der Transplantation von virusfreien Organen auf chronische Virusträger, die Restvirus haben und sich neue Organe infizieren kön-

nen wie auch bei der Übertragung von Virus-haltigen Organen von Spendern auf virusfreie Patienten

- Verhinderung der Etablierung einer systemischen Hepatitis-Virus-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösem Virus oder zur
- 5 - Minderung oder Eliminierung der Leberentzündung durch Immunsystem-vermittelte Mechanismen.

[0050] Eine weitere Verwendung von Proteasom-Inhibitoren besteht in der Verhinderung der Etablierung einer systemischen Hepatitis-Virusinfektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösem Virus (zum Beispiel bei Nadel-Stich-Verletzungen mit Virus-kontaminiertem Blut oder Blutprodukten).

[0051] Eine weitere Verwendung von Proteasom-Inhibitoren ist die Vorbeugung einer Hepatitis-Virusinfektion bei Personen mit hohem Risiko einer Neuinfektion, zum Beispiel bei Ärzten und anderem Risiko-Personal, Drogenabhängigen, Reisenden in hochendemische Gebiete für Hepatitis-Viren, in der Krankenbehandlung, für Familienangehörige von chronischen Virusträgern.

[0052] Eine weitere Verwendung von Proteasom-Inhibitoren besteht in der Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei Leber- und anderen Organtransplantationen sowie bei Zelltherapien durch Gabe der Mittel vor, während und einige Zeit nach der Transplantation. Die Gabe dieser Mittel ist angezeigt sowohl für die Hochrisikosituation bei der Transplantation von virusfreien Organen auf chronische Virusträger, die immer Restvirus haben und wo sich neue Organe infizieren können, als auch für die Übertragung von Virus-haltigen Organen von Spendern auf virusfreie Patienten.

[0053] Eine weitere Verwendung besteht in der Behandlung von HCV-induzierten Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel der gemischten TypII Kryoglobulinämie.

[0054] Eine weitere Verwendung liegt in der Kombination mit bereits in der anti-HCV-Therapie verwendeten Therapeutika.

[0055] Eine wesentliche Anwendung besteht in der Verwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Herstellung von Mitteln bzw. pharmazeutischen Zubereitungen zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Hepatitisviren sowie zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe von Hepatitiden.

[0056] Eine weitere Anwendung besteht darin, dass Proteasom-Inhibitoren die posttranslationale Modifikation der Virus-Strukturproteine verändern und somit die Freisetzung und Infektiosität von Flaviviridae herabsetzen oder blockieren.

[0057] Eine weitere Verwendung von Proteasom-Inhibitoren besteht in der Behandlung von mit Flavivirus infizierten Personen, also zum Beispiel Personen, die akut an West-Nil-, Gelbfieber, Dengue-Fieber (7-Tage-Fieber oder Dengue Hämorrhagischem Fieber) oder Arbovirus-Encephalitis erkrankt sind. Proteasom-Inhibitoren können auch hier zur Vorbeugung einer

Virusinfektion bei Risikopersonen wie Ärzten oder Reisenden in hochendemische Gebiete für West-Nil-Virus, Dengue-Fieber-Virus, Gelbfieber-Virus oder FSME-Virus eingesetzt werden. [0058] Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist die Behandlung von Pestivirus-infizierten Stalltieren mit Proteasom-Inhibitoren.

5

[0059] Zur Lösung der Aufgabe wurden im Rahmen der Erfindung molekularvirologische, biochemische, immunbiologische und elektronenmikroskopische Studien an Zellen durchgeführt, die mit verschiedenen Vertretern der *Flaviviridae* infiziert oder mit viralen RNA-Molekülen transfiziert wurden. Erfindungsgemäß wurden die durch Proteasom-Inhibitoren ausgelösten Defekte durch folgende Mittel und Verfahren bestimmt: (i) Viruspräparationen von BVDV (Stamm CP7) und West-Nil-Flavivirus mit definiertem Titer infektiöser Einheiten; (ii) Virus-Endpunkt-Titrationsverfahren durch mikroskopische Detektion infektiöser viraler Partikel über Plaque-Formation oder Immunfärbeverfahren; (iii) cDNA-Konstrukte zur Herstellung subgenomischer BVDV- und HCV-RNA-Replikon durch *in vitro*-Transkription; (IV) RNase-Protektionsverfahren zur Detektion/Quantifizierung viraler RNA-Moleküle; (v) Immunofluoreszenz-Tests zur Bestimmung der Replikationsfähigkeit viraler RNA-Moleküle bzw. zur Bestimmung der Ausbreitung einer Infektion; (vi) Elektronenmikroskopische Verfahren zur Untersuchung der Morphologie viraler Partikel während und nach dem Infektionsvorgang, (vii) Western-Blot Studien und Immunoprecipitationsverfahren an BVDV- und HCV-Proteinen.

[0060] Die Prinzip-Lösung der Aufgabe wird an den Beispielen von BVDV und West-Nil-Virus gezeigt, d.h. zwei charakteristischen Vertretern der Genera *Pestivirus* bzw. *Flavivirus* der *Flaviviridae*-Familie. In Kontrollversuchen wurde zunächst dargestellt, dass eine Vorbehandlung der Target-Zellen (MDBK-Zellen für BVDV, BHK-21-Zellen für West-Nil-Virus) mit nicht-zytotoxischen Konzentrationen verschiedener Substanzklassen von Proteasom-Inhibitoren keinen Einfluss auf eine nachfolgende Infektion der Viren hat. Ebenso wurde gezeigt, dass eine Vorbehandlung von BVD-Viren und West-Nil-Viren mit nicht-toxischen Konzentrationen verschiedener Proteasom-Inhibitoren keinen Einfluss auf deren Infektiosität hat.

[0061] Im Rahmen der Erfindung wird erstmalig gezeigt, dass die Behandlung von bereits infizierten Zellen mit verschiedenen Proteasom-Inhibitoren die Produktion von infektiösen Viruspartikeln signifikant hemmt: Durch Virus-Endpunkt-Titration auf nicht-infizierten Zellen wurde erfindungsgemäß festgestellt, dass die Anzahl freigesetzter infektiöser Nachkommenviren aus infizierten Zellen, die mit Proteasom-Inhibitoren behandelt wurden, im Vergleich zu Mock-behandelten Zellen um mehrere log-Stufen sinkt. Neben der drastischen Reduktion der Anzahl an Nachkommenviren verursacht die Behandlung mit Proteasom-

Inhibitoren auch eine deutliche Abnahme der spezifischen Infektiosität der Nachkommenviren. Die spezifische Infektiosität wurde über die Anzahl der in den Kulturüberstand infizierter Zellen freigesetzten Virusgenome (gemessen durch quantitative RNase-Protektion) im Verhältnis zum Titer der infektiösen Einheiten bestimmt. In Immunfluoreszenzstudien wurde
5 deutlich, dass sowohl die RNA-Replikation als auch die Ausbreitung der Infektion in Zellkultur unter dem Einfluss verschiedener Proteasom-Inhibitoren stark reduziert ist. Die Reduktion der RNA-Replikation in den infizierten und mit Proteasom-Inhibitoren behandelten Zellen wurde erfindungsgemäß durch Messung der RNA-Replikationsprodukte via RNase-Protektion bestätigt.

10 **[0062]** Weiterhin wurde durch die Verwendung von Western-Blotkinetik-Studien festgestellt, dass die Virusfreisetzung von BVDV-infizierten Zellen signifikant reduziert ist, wenn diese Zellen kurze Zeit nach einer Infektion mit Proteasom-Inhibitoren behandelt wurden.

[0063] In überraschendem Gegensatz dazu wurde in einem weiteren Teil der Erfindung festgestellt, dass die verschiedenen Substanzklassen von Proteasom-Inhibitoren nur geringe Effekte auf die Replikation von persistent in MDBK- bzw. Huh-7-Zellen transfizierte BVDV-
15 und HCV-RNA-Replikons haben. Diese Ergebnisse zeigten, dass Proteasom-Inhibitoren nicht oder nur in geringem Maße mit folgenden durch virale Elemente und Faktoren katalysierten Vorgängen interferieren: (i) Mit der Translation der viralen RNA über das in der 5'-UTR enthaltene IHRES (interne Ribosomen-Eintrittsstelle) -Element; (ii) Mit der von den viralen Proteasekomplexen NS3/NS4A bzw. NS2-NS3 mediierten Proteolyse des Nicht-Strukturpolypeptids;
20 (iii) Mit der von den viralen Proteinen NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (und hypothetischen Zwischenprodukten des Nicht-Strukturpolypeptids) und den nicht-translatierten Regionen des Genoms katalysierten Replikation der viralen RNA. Die Targets klassischer anti-viraler Substanzen, d.h. die IRES, die viralen Proteasen, die NS3-ATPase/RNA-Helikase sowie die NS5/NS5B-RdRp (siehe Einleitung), werden also von Proteasom-Inhibitoren nicht oder nur geringfügig gehemmt. Die drastische Verminderung der Sekretion infektiöser Nachkommenviren bei Behandlung infizierter Zellen mit Proteasom-Inhibitoren kann demnach nicht oder nicht ausschließlich auf die zu beobachtende Verminderung der RNA-Replikationsrate zurückgeführt werden, sondern muss folglich Vorgänge
25 betreffen, die das Virus-Entry und/oder das Uncoating und/oder die Assemblierung und/oder Sekretion von Nachkommenviren betreffen.

[0064] Diese Hypothese wurde erfindungsgemäß durch Virus-Zell-Adhäsionsexperimente und durch elektronenmikroskopische Untersuchungen untermauert. So wurde einerseits festgestellt, dass Nachkommenviren, die aus infizierten Zellen unter Proteasom-Inhibitor-
35 Behandlung freigesetzt werden, bedeutend ineffizienter an Target-Zellen adhären. Weiterhin sind nach Behandlung infizierter Zellen mit Proteasom-Inhibitoren im Vergleich zu Mock-behandelten Zellen Unterschiede in der Anzahl der über Elektronenmikroskopie gene-

rell in den Zellen zu detektierenden Viruspartikel, Unterschiede im Verhältnis von kompletten zu nicht-kompletten Virionen sowie Unterschiede in der Morphologie der sekretierten Nachkommenviren festzustellen.

[0065] In einem weiteren Teil der Erfindung wird gezeigt, dass in Gegenwart von Proteasom-Inhibitoren signifikante Veränderungen in der post-translationalen Modifikation der BVDV- und HCV-Strukturproteine, der Prozessierung des Strukturprotein-Polypoteins und der Dimerisierungsfähigkeit der Envelope-Proteine auftreten. Diese Veränderungen könnten damit kausal die Effekte von Proteasom-Inhibitoren auf den viralen Lebenszyklus, wie sie bei Pestiviren und Flaviviren festgestellt wurden, erklären.

[0066] Erfindungsgemäß wird damit gezeigt, dass der hemmende Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die Virusvermehrung von verschiedenen Vertretern der *Flaviviridae*-Familie auf folgenden Mechanismen beruht:

1. Blockierung/Reduktion des Entry- und/oder Uncoating-Prozesses der viralen RNA.
2. Blockierung / Reduktion des Assembly und / oder der Sekretion von Nachkommenviren.
3. Blockierung/Reduktion der Infektiosität von freigesetzten Virionen.
4. Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung.

[0067] Diese Mechanismen implizieren, dass Proteasomen-Inhibitoren die Infektionsausbreitung von verschiedenen Mitgliedern der *Flaviviridae*-Familie auch in infizierten Organen blockieren. Die ausgeprägten Homologien von Pestiviren und Hepatitis-C-Viren rechtfertigt ferner die Annahme, dass Proteasomeninhibitoren eine ähnliche Wirkung bei HCV-Infektionen haben.

[0068] In einem weiteren Teil der Erfindung wird gezeigt, dass primäre Leberzellen relativ resistent gegenüber Proteasom-Inhibitoren sind (bis zu einer Konzentration von etwa 10 μ M), während proliferierende Karzinomzellen, darunter auch Leberkarzinomzellen, bereits bei 1000-fach niedrigeren Konzentrationen von Proteasom-Inhibitoren abgetötet werden. Das im Vergleich zu primären Hepatozyten bevorzugte Absterben von Leberkarzinomzellen begründet sich in der anti-neoplastischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren. Damit besteht der wesentliche Vorteil dieser Erfindung darin, dass mit der Behandlung von Proteasom-Inhibitoren zwei wesentliche Effekte ausgelöst werden können, die für die Bekämpfung von durch HCV-Infektionen verursachte Lebererkrankungen von großer Bedeutung sind: Zum einen wird die Produktion von infektiösen Viruspartikeln und damit die Infektionsausbreitung im Organismus gehemmt. Zum anderen wird die Entstehung, das Wachstum und die Metastasierung von Leberzelltumoren verhindert, welche infolge einer HCV-Infektion nach einer Persistenzphase sehr häufig auftritt. Darüber hinaus werden bereits bestehende Leberkarzinome

durch die Proteasom-Inhibitoren zerstört, nicht aber die wenig oder nicht proliferierenden normalen Zellen der Leber.

[0069] Aufgrund dieser neuartigen Behandlungsmethode können daher vielfältige therapeutische Effekte durch den Einsatz von Proteasom-Inhibitoren bei Infektionen mit Mitgliedern der *Flaviviridae*-Familie ausgelöst werden. Neben den ausgeführten Vorteilen besteht ein weiterer wesentlicher Vorteil darin, dass mit dieser Strategie zelluläre Faktoren getroffen werden, welche für den Lebenszyklus von *Flaviviridae* essentiell sind, die jedoch eine im Vergleich zu viralen Faktoren erheblich höhere genetische Stabilität haben. Aufgrund dieser genetischen Stabilität der Zielstruktur dieser neuartigen anti-viralen Strategie ist mit dem Auftreten von Resistenz-Erscheinungen, wie sie für viele der bislang bekannten Inhibitoren von RNA-Viren beobachtet werden konnten, nicht zu rechnen.

[0070] Die Merkmale der Erfindung gehen aus den Elementen der Ansprüche und aus der Beschreibung hervor, wobei sowohl einzelne Merkmale als auch mehrere in Form von Kombinationen vorteilhafte Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantragt wird. Das Wesen der Erfindung liegt in der Verwendung bekannter Mittel zu einem neuen Zweck und in einer Kombination bekannter Elemente - den Proteasom-Inhibitoren - und einer neuen Wirkung - ihrem Einsatz zur Behandlung von *Flaviviridae*-Infektionen - die in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Vorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, dass nunmehr Mittel zur Vorbeugung, Behandlung, Therapie und Hemmung der von verschiedenen Mitgliedern der Virusfamilie *Flaviviridae* (Genera: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus*) verursachten Krankheiten beim Menschen und bei Tieren zur Verfügung stehen.

[0071] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ebenfalls dargestellt, dass durch den Einsatz von Proteasom-Inhibitoren die Produktion von BVDV von infizierten Zellen verhindert werden kann. Zur Lösung dieser Aufgabe werden kultivierte Zellen mit BVDV (Stamm CP7, NADL) infiziert und nach Ausbreitung der Infektion in der Kultur im Verlauf einer Zeitkinetik BVDV-Virionen isoliert und deren Menge biochemisch quantifiziert. Damit wird bewiesen, dass unter Verwendung verschiedenster Proteasom-Inhibitoren die Produktion von Virionen der *Flaviviridae*-Familie in einer infizierten Zelle gehemmt werden kann.

[0072] Das in der Erfindungsbeschreibung dargestellte Prinzip der Verwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Blockierung einer Infektion mit *Flaviviridae* ist neuartig in Hinsicht auf die Verwendung einer bereits bekannten Substanzklasse (den Proteasom-Inhibitoren) für eine neue Aktivität, welche sich in folgenden therapeutischen Konzepten zusammenfassen lässt:

[0073] die Blockierung der Produktion von infektiösen *Flaviviridae* und damit die Verhinderung der Infektionsausbreitung *in vivo*, zum Beispiel dem Leber-Gewebe einer HCV-infizierten Person;

[0074] im Zusammenhang mit den beschriebenen Effekten auf Hepatomazellen betrifft diese Aktivität auch die Induktion des Absterbens von Leberkarzinomzellen, welche in direkter oder indirekter Folge einer Infektion mit HCV entstanden sind.

[0075] Gleichzeitig ist die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren auch neuartig hinsichtlich des Anwendungsprinzips. Bislang sind keine Substanzen/ Prinzipien/ Methoden bekannt, welche vorwiegend frühe oder späte Prozesse der Replikation von *Flaviviridae*, speziell die Freisetzung von infektiösen Virionen beeinflussen. Weiterhin ist neu, dass die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Blockierung des Lebenszyklus von *Flaviviridae* führt. Neuartig ist die bei der Applikation von Proteasom-Inhibitoren erheblich geringere Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Resistenzmechanismen im Vergleich zu bisherigen anti-viralen Methoden, die bei der Behandlung von RNA-Virus-Infektionen eingesetzt werden. Dies ist begründet durch die Tatsache, dass Proteasom-Inhibitoren weniger essentielle Komponenten des Virus direkt treffen, als vielmehr auf zelluläre Funktionen wirken, die offenbar für die Viriongenese wichtig sind. Die ist spezifisch messbar an den Effekten die Proteasom-Inhibitoren auf die Modifikation und Prozessierung sowie das Assoziationsverhalten der Virusstrukturproteine.

[0076] Neuartig ist weiterhin das Prinzip der Wirkung von Proteasom-Inhibitoren, die zwar nicht die Initiation der Virusinfektion, wohl aber die Produktion von infektiösen Viruspartikeln von bereits mit *Flaviviridae* infizierten Zellen verhindern. Dadurch wird wesentlich die Menge an infektiösen Virionen (Viruslast) und somit die Infektionsausbreitung *in vivo* reduziert.

[0077] Aus der Summe dieser neuartigen Mechanismen lässt sich feststellen, dass die verminderte Freisetzung von noch dazu wenigen oder gar nicht infektiösen Viruspartikeln im Netto-Effekt im Falle einer *in vivo*-Anwendung von Proteasom-Inhibitoren die Menge an infektiösen Virionen in einem infizierten Organismus verringern sollte. Im Falle von HCV ist die Anwendung von Proteasomen-Inhibitoren allein oder in Kombination mit bereits angewendeten anti-viralen Therapien besonders attraktiv.

[0078] Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

Primäre Tupaia-Hepatozyten sind relativ resistent gegenüber den toxischen Effekten von Proteasom-Inhibitoren. Im Vergleich dazu sind proliferierende Zellen, darunter auch Leberkarzinom(Hepatoma)-Zelllinien erheblich sensibler gegenüber den toxischen Effekten von Proteasom-Inhibitoren.

[0079] Das UPS ist in zahlreiche zelluläre Mechanismen involviert. Dementsprechend kann eine vollständige Inhibition der Proteasom-Aktivität auf längere Zeit nicht mit der Vitalität einer Zelle vereinbart werden. Jedoch zeigen verschiedene Zelltypen unterschiedliche Sensitivität gegenüber der toxischen Wirkung der Inhibitoren. Dabei ist auffällig, dass sich rasch teilende und/oder aktivierte Zellen in der Regel eine höhere Sensitivität gegenüber Proteasom-Inhibitoren besitzen im Vergleich zu ruhenden und/oder nicht aktivierten Kulturen. Darauf beruht die anti-neoplastische Wirkung der Proteasom-Inhibitoren. Um die Toxizität von Proteasom-Inhibitoren auf verschiedene Zelllinien in Kultur (MDBK, BHK-21-Zellen), darunter auch humane transformierte Hepatomazellen (Huh-7) zu testen, wurden Dosis-Limitierungsstudien mit Proteasom-Inhibitoren durchgeführt. Im Vergleich dazu wurden die gleichen Dosis-Limitierungsstudien mit Proteasom-Inhibitoren mit primären Hepatozyten durchgeführt.

[0080] Als Beispiel für primäre Hepatozyten wurden Hepatozyten aus 10–12 Wochen alten Tupaia (*Tupaia-belangeri*) gewonnen, die entsprechend den internationalen Richtlinien zur Versuchstierhaltung gehalten und behandelt wurden. Tupaia wurden aus dem Grund gewählt, weil in einem kürzlich erschienenen Report Tupaia-Hepatozyten als mögliches in vitro Infektionsmodell für Hepatitis-C-Virus vorgeschlagen wurde (Zhao et al., 2002). Gewinnung und Züchtung der primären Hepatozyten erfolgte entsprechend dem Protokoll von Köck et al. (2001). Die Tupaia-Hepatozyten wurden in einer Dichte von 2×10^6 bis 3×10^6 Zellen/ml Williams E-Medium (2 ml pro well) auf Kollagen-beschichteten Platten (Becton Dickinson Co., Bedford, Massachusetts, USA) ausgebracht. Parallel-Kulturen wurden mit steigenden Dosen bestimmter Proteasom-Inhibitoren, im folgenden als PI bezeichnet, (jeweils 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 100 nM, 20 nM, 10 nM und 1 nM) für 30 Stunden behandelt. Etwa alle 12 Stunden wurden die Zellen hinsichtlich Morphologie und Vitalität lichtmikroskopisch untersucht. Zusätzlich wurde deren Funktionalität mittels Fluoreszenzvitalfärbung mit Fluoreszeindiacetat (FDA) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) bestimmt (Yagi et al., 2001). FDA wird aktiv und präferenziell von Hepatozyten aufgenommen und dort mittels einer Lipase, die exklusiv in Hepatozyten exprimiert wird, in Fluoreszein konvertiert und bewirkt die Fluoreszenzfärbung des Zytoplasmas, ein Zeichen für die Funktionsfähigkeit und Vitalität von Hepatozyten. In

diesem Experiment wurden die behandelten und unbehandelten Tupaia-Hepatozyten mit FDA-haltigem Williams E-Medium (5 µg/ml) für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Vitalität der Hepatozyten mittels eines inversen Epifluoreszenzmikroskops beurteilt. Alle Kulturen, die mit bis zu 1 µM PI behandelt wurden, zeigten weder eine morphologische Veränderung noch Hinweise auf eingeschränkte Vitalität, d.h. sie waren nicht zu unterscheiden von unbehandelten Hepatozyten. Bei Behandlung mit 5 µM PI oder höher wurden in den Nicht-Hepatozyten, die in Kulturen von primären Hepatozyten immer mit vorliegen, deutliche morphologische Veränderungen wie zum Beispiel abgerundete Zellen und intrazelluläre Vakuolenbildung beobachtet. Die Vitalität der Hepatozyten dagegen war nicht verändert gemäß visueller Beurteilung und Fluoreszenzintensität. Erst ab einer Konzentration von 10 µM PI traten erste Zeichen einer toxischen Wirkung auch in Hepatozyten auf. Ähnliche Ergebnisse wurden mit unterschiedlichen PI, wie zum Beispiel Lactacystin und Epoxomicin, beobachtet. Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass primäre Tupaia-Hepatozyten relativ hohe Konzentrationen von bis zu ca. 10 µM Proteasom-Inhibitor tolerieren können.

[0081] Um den Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf proliferierende Zellen und vor allem auch proliferierende Hepatoma-Zellen zu testen, wurden verschiedene immortale Zelllinien animalen und humanen Ursprungs kultiviert. In der Regel wurden die Zellen in Dulbeccos' modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) kultiviert, das mit folgenden Komponenten angereichert war: 2% (v/v) Aminosäure Stammlösung (0.712 g L-Alanin, 1.2 g L-Asparaginsäure, 2.8 g Glyzin, 1 g Prolin bezogen auf 800 ml Lösung); 0.1 mg/l d-Biotin (Sigma-Aldrich); 25 mg/l Hypoxanthin (Sigma-Aldrich), 3.7 g/l NaHCO₃ (Merck, Darmstadt), 10% (v/v) fötales, hitze-inaktiviertes Kälberserum (Biochrom AG, Berlin); 100 Einheiten/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin). Einerseits wurden BHK-21- und MDBK-Zellen getestet, für die bekannt war, dass sie mit Flaviviren oder Pestiviren infiziert werden können. Als Beispiel für eine Hepatomazelllinie wurden Huh-7-Zellen verwendet; diese Zellen unterstützen als bisher einzige Linie die Replikation von HCV-Replikon-RNAs (Lohmann *et al.*, 1999). Die Zellen wurden bei einer niedrigen Dichte von etwa 0.5×10^6 auf einer 6-well Platte ausgesät. Etwa 24 Stunden später wurde das Medium gewechselt und in Parallel-Ansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Proteasom-Inhibitoren versetzt. Die Vitalität der Zellen wurde etwa 30 Stunden später entweder lichtmikroskopisch (Begutachtung der Zellmorphologie) oder über einen Trypanblau-Ausschlusstest überprüft. Bei den drei genannten Zelllinien ließen sich erst bei Konzentrationen von ≤ 20 nM der verschiedenen Proteasom-Inhibitoren keine negativen Effekte auf die Vitalität der Zellen feststellen. Damit wurde deutlich, dass proliferierende Zellen, speziell proliferierende Hepatozyten im Vergleich zu primären Hepatozyten erheblich sensibler sind gegenüber der toxischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren. In den nachfolgend geschilderten Beispielen wur-

den die verschiedenen Proteasomen-Inhibitoren bei einer Konzentration von 10 nM eingesetzt.

5 Beispiel 2:

Die Behandlung von *Flaviviridae*-infizierten Zellkulturen mit moderaten Konzentrationen von Proteasomen-Inhibitoren reduziert drastisch die Freisetzung und Ausbreitung infektiöser Nachkommenviren.

10 [0082] In einem Kontrollexperiment sollte zunächst getestet werden, welchen Effekt eine Vorbehandlung der Zellen mit Proteasomen-Inhibitoren auf eine Infektion mit verschiedenen *Flaviviridae*-Mitgliedern hat. Dazu wurden nicht-infizierte MDBK-Zellen und BHK-21-Zellen in Parallel-Ansätzen für unterschiedliche Zeiträume in Zellkulturmedium gehalten, das mit verschiedenen PI (Konzentration 10 nM) versetzt wurde. Die Zeitintervalle dieser Behandlung reichten dabei von 1-8 Stunden. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nachfolgend mit einem geringen Volumen an Pestivirus (BVDV CP7) oder Flavivirus (West-Nil-Virus)-haltigem Kulturmedium bei einer MOI von 1-5 versetzt (MOI=multiplicity of infection=Anzahl der pro Zelle eingesetzten infektiösen Viruspartikel; diese war zuvor durch Virustitration ermittelt worden). Nach einer Infektionsphase von etwa 20 einer Stunde bei 37°C wurde überschüssiges und/oder nicht infektiöses Virus durch einen Waschschrift mit PBS entfernt und die infizierten Zellen mit frischem Kulturmedium weiter gezüchtet. Nach einem Replikationszyklus, d.h. etwa 12 Stunden (West-Nil-Flavivirus) bzw. 30 Stunden (BVDV) wurde der virushaltige Kulturüberstand der Zellen abgenommen. Da es sich bei BVDV CP7 und West-Nil-Virus um zytopathische (zp) Viren handelt, ließ sich zu 25 diesen Zeitpunkten in der Regel ein zytopathischer Effekt der Virusinfektion (ZPE) bei den infizierten Zellen feststellen. Der ZPE kann lichtmikroskopisch durch das Abrunden, Schrumpfen und Ablösen infizierter Zellen von der Kulturplatte festgestellt werden. Darüber hinaus wurde in parallel durchgeführten Immunofluoreszenztests mit spezifischen Antikörpern gegen virale Proteine (gemessen wurde dabei ausschließlich die replikationsabhängige 30 Synthese dieser Proteine) gezeigt, dass zu diesen Zeitpunkten in praktisch allen Zellen virale Replikation festgestellt werden kann (Standardprotokoll; siehe auch Behrens *et al.*, 1998). Die Anzahl der im Kulturmedium enthaltenen infektiösen Viruspartikel wurde über eine Endpunkt-Titration (Standardprotokoll) auf nicht-infizierten BHK (West-Nil-Flavivirus) bzw. MDBK- (BVDV)-Zellen festgestellt. Aufgrund des zytopathischen Charakters beider Viren 35 ließ sich der Titer durch die Formation von Plaques im Zellrasen mikroskopisch oder über Immunfärbeverfahren eines der viralen Proteine (Standardprotokolle) ermitteln. Zur Bestimmung der im Zellkulturüberstand insgesamt enthaltenen relativen Anzahl an Virusgenomen

wurde ein definiertes Volumen des Zellkultur-Überstandes auf eine Endkonzentration von 0.5% (m/v) SDS (Sodium Dodecylsulfat), 150 mM NaCl und 50 mM Tris/Cl pH 7.5 gebracht und die enthaltenen Proteine durch Zugabe von 20µg/ml des Enzyms Proteinase K (PK) hydrolysiert. Die verbliebenen Nukleinsäuren wurden durch eine Phenol- und eine nachfolgende Chloroform-Extraktion gereinigt und durch Ethanol präzipitiert (Standard-Protokolle). Die in dem Zell-Überstand enthaltene virale RNA wurde durch ein von Behrens *et al.* (1998) und Grassmann *et al.* (1999) entwickeltes spezielles RNase-Protektionsverfahren quantifiziert. Das generelle Prinzip dieser Detektionsmethode beruht auf dem Einsatz kurzer durch Transkription *in vitro* (Standardprotokoll) hergestellter [³²P]-markierter RNA-Moleküle ("Probes"), die eine zu den viralen RNA-Molekülen komplementäre ("anti-sense") Orientierung aufweisen. Nach Hybridisierung der Proben an die virale RNA werden durch Umsetzung mit den einzelstrang-spezifischen Ribonukleasen A und T1 nicht gepaarte Bereiche der RNA verdaut und die Anzahl der doppelsträngigen ("RNase-protegierten") viralen RNA-Moleküle über die Messung der gleichfalls protegierten, markierten Probe-Moleküle quantifiziert (Grassmann *et al.*, 1999). Durch Bildung des Verhältnisses der insgesamt in einem bestimmten Volumen Zellüberstand enthaltenen Virusgenome und der durch Titration ermittelten Anzahl der infektiösen Nachkommenviren wurde die spezifische Infektiosität der neu assemblierten Nachkommenviren ermittelt. In Fig. 1 ist gezeigt, dass eine Vorbehandlung der Wirtszellen mit verschiedenen PI einen verhältnismäßig geringen Effekt auf eine nachfolgende Virusinfektion hat: Sowohl der Titer als auch die spezifische Infektiosität von Nachkommenviren sind bei einer Flavivirus und Pestivirus-Infektion, die nachfolgend auf eine Behandlung der entsprechenden Wirtszellen mit Proteasom-Inhibitoren durchgeführt wurde, im Vergleich zu einer Kontrolle mit Mock-behandelten Zellen geringfügig oder nicht verändert.

[0083] In einem weiteren Kontrollexperiment wurde überprüft, ob eine direkte Behandlung von *Flaviviridae*-Viruspartikeln mit Proteasom-Inhibitoren einen Einfluss auf die Infektiosität der Viren hat. Dazu wurden Kulturmedium-Überstände infizierter Zellen, die eine definierte Anzahl an West-Nil-Flavivirus bzw. BVDV-Viruspartikeln enthielten (diese wurde zuvor durch Virustitration ermittelt), mit verschiedenen PI (Konzentration wie in den oben beschriebenen Experimenten 10nM) versetzt und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Es wurde festgestellt (Fig. 2), dass durch die Behandlung des Virusüberstandes mit Proteasom-Inhibitoren die Anzahl an infektiösen Einheiten im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle nicht wesentlich reduziert wurde.

[0084] Damit kann folgendes festgestellt werden. 1. Die Behandlung von Viruspartikeln verschiedener Vertreter der *Flaviviridae* mit Proteasomen-Inhibitoren hat keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Infektiosität dieser Virus-Partikel. 2. Die Vorbehandlung der Zellen für maximal 8 Stunden mit Proteasomen-Inhibitoren hat keinen Einfluss auf eine sich der Behandlung anschließende Infektion der Zellen durch *Flaviviridae*; d.h., die für die Virusinfek-

tion wichtigen zellulären Strukturen an der Zellmembran werden durch die Proteasom-Inhibitoren nicht oder kaum beeinflusst.

[0085] Um den Einfluss von Proteasomen-Inhibitoren auf die sich dem unmittelbaren Infektionsvorgang anschließenden Ereignisse einer *Flaviviridae*-Infektion wie Virus-Entry/Internalisierung, Uncoating, RNA-Replikation sowie Assembly und Sekretion sowie Infektiosität von Nachkommenviren (siehe Einleitung) zu untersuchen, wurden BHK- und MDBK-Zellen mit dem West-Nil-Flavivirus bzw. mit dem BVDV in einer Reihe von Parallel-Ansätzen in der oben genannten Weise infiziert. Nach dem Waschen der infizierten Zellen mit PBS wurden diese in frischem Medium aufgenommen, das mit 10 nM verschiedener PI versetzt wurde. Nach 12 (West-Nil-Flavivirus) bzw. 30 Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurde der Kulturüberstand in der beschriebenen Weise gewonnen. Die Zellen wurden im Anschluss an den genannten Infektionszeitraum mit einem Rubber-Policeman von der Kulturplatte abgekratzt, in PBS gewaschen und für die weitere Verwendung auf Eis gehalten oder eingefroren. Die Anzahl neu assemblierter Nachkommenviren bzw. deren spezifische Infektiosität wurde über Virustitration und das genannte RNase-Protektionsverfahren aus dem Kulturüberstand ermittelt. Zur Messung der intrazellulären Replikation wurde die virale RNA aus den infizierten Zellen gewonnen. Dazu wurden die Zellen in einem Lysepuffer (50 mM Tris/Cl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% v/v NP40) für 10 Minuten auf Eis aufgeschlossen, die Zellkerne über eine Zentrifugation bei 1000 g abgetrennt und die virale RNA aus dem Zytoplasma durch PK-Verdau, Phenol- und Chloroformextraktion sowie Ethanol-Präzipitation gewonnen. Die Anzahl der in den Zellen enthaltenen viralen RNA-Replikationsprodukte (Minus-Strang RNA Intermediat und neu synthetisierte Plus-Strang RNA) wurde durch RNase-Protektion quantifiziert. Um die bei verschiedenen Infektionsexperimenten auftretende Variation der Zellzahl auszugleichen, wurde folgendermaßen verfahren: Durch Messung der optischen Dichte (OD₂₆₀; Standard-Protokoll) wurde die Gesamtmenge der extrahierten zytoplasmatischen RNA bestimmt (in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass auch bei effizient replizierenden Viren nur ein Bruchteil der Gesamt-Zytoplasma-RNA virale RNA ist) und eine definierte Quantität dieser RNA in den RNase-Protektionsexperimenten eingesetzt. In Fig. 3-5 ist gezeigt, dass sowohl die RNA-Replikationsrate als auch die Anzahl an freigesetzten Nachkommenviren infolge der Behandlung der Zellen mit PI nach der Infektion signifikant herabgesetzt war. Dabei konnten allerdings deutliche Unterschiede zwischen den PI beobachtet werden: So war der Effekt von Lactacystin gering, während eine Behandlung mit Epoxomycin oder einem Proteasominhibitor Pi maximale Wirkung zeigte, d.h. eine Reduktion der RNA-Replikationsrate um ca. einen Faktor von 5-10 und Reduktion der Anzahl freigesetzter Nachkommenviren um mehrere Log-Stufen. Es konnte auch eine deutliche Reduktion der spezifischen Infektiosität, d.h. des Verhältnisses

der Anzahl der im Überstand detektierbaren RNA-Genome zu der Anzahl der im Titrationstest ermittelten infektiösen Einheiten (um etwa einen Faktor 50-100) ermittelt werden.

[0086] Um zu testen, ob die festgestellte geringere Infektiosität der Nachkommenviren durch eine verminderte Adhäsionsfähigkeit der Viruspartikel an die Zielzelle bedingt ist, wurde folgendes Experiment durchgeführt: BHK- und MDBK-Zellen wurden in parallelen Ansätzen mit West-Nil-Flavivirus- bzw. BVDV-haltigen Überständen versetzt, die aus PI-behandelten bzw. nicht-behandelten Infektionsexperimenten gewonnen worden waren. Wichtig war in diesem Zusammenhang, dass eine jeweils identische MOI bei der Infektion eingesetzt wurde. Nach einer Inkubationsphase bei 4°C für eine Stunde wurde ein Teil der Zellen für eine Stunde auf 37°C gebracht, der andere Teil der Zellen wurde sofort weiter aufgearbeitet. Die Zellen wurden durch Abkratzen von der Platte gewonnen, und aus den jeweiligen Ansätzen wurde anschließend die Gesamt-RNA durch PK-Verdau und Phenol- und Chloroform-Extraktion gewonnen. Das Verhältnis der bei 4°C an die Zellen adhärirten und bei 37°C verbliebenen/internalisierten viralen RNA-Genome wurde anschließend über eine RNase-Protektion quantifiziert. Dabei wurde deutlich, dass die Viruspartikel, die als Nachkommenviren aus Proteasom-Inhibitor behandelten Zellen sekretiert wurden, erheblich weniger infektiös sind als Viren, die aus unbehandelten Zellen gewonnen wurden.

[0087] Konsequenterweise ließ sich in Zellkulturen von mit Flavi-, und Pestiviren infizierten Zelllinien in Gegenwart von Proteasomen-Inhibitoren eine deutliche Verminderung der Infektionsausbreitung feststellen. Letztere Tatsache ließ sich durch Immunfluoreszenztests besonders eindrucksvoll belegen: Während bei einer Infektion unter Mock-Behandlung typische Plaqueformationen der infizierten Zellen unter dem Mikroskop ausgemacht werden – dies ist eine Folge der horizontalen Ausbreitung der Virusinfektion - war dies unter PI-Behandlung nicht der Fall (Fig. 5).

[0088] Zusammengefasst verdeutlichen diese Experimente, dass die Behandlung infizierter Zellen mit Proteasom-Inhibitoren zu einer Blockierung/Reduktion der Replikationsrate der viralen RNA in infizierten Zellen, zu einer Blockierung/Reduktion der Freisetzung von neuen Virionen und zu einer Blockierung/Reduktion der Infektiosität von freigesetzten Nachkommenviren führen. Als Konsequenz wird die Infektionsausbreitung der Viren vermindert. Die Beobachtung, dass Proteasom-Inhibitoren den Lebenszyklus sowohl von Flaviviren als auch Pestiviren maßgeblich inhibieren, erlaubt den Rückschluss, dass diese Mittel in ähnlicher Weise auch auf die Infektion und auf die Infektionsausbreitung anderer Mitglieder der *Flaviviridae*-Familie wie Hepatitis-C-Viren und GB-Viren wirken, für die bisher keine infektiösen Zellkultursysteme etabliert werden konnten.

Beispiel 3:Proteasomen-Inhibitoren haben nur geringe Effekte auf die intrazelluläre Replikation von BVDV- und HCV-RNA.

5

[0089] Zur eingehenderen Untersuchung des Effektes von Proteasom-Inhibitoren auf die intrazelluläre Replikation des viralen RNA-Genoms wurde auf Zelllinien zurückgegriffen, die ein persistentes BVDV-RNA-Replikon oder ein persistentes HCV-RNA-Replikon enthalten (Fig. 7 und 8). Für die Herstellung dieser Zelllinien (MDBK für BVDV, Huh-7 für HCV)

10 wurden bizistronische RNA-Replikonkonstrukte verwendet, die neben dem für die viralen Proteine kodierenden ORF noch ein weiteres Gen enthalten, das für einen Selektionsmarker kodiert, also zum Beispiel das Gen für Hygromycin-B-Phosphotransferase. Hygromycin-B-Phosphotransferase inaktiviert das Antibiotikum Hygromycin B, einen Inhibitor der zellulären Translation. In den bizistronischen Konstrukten wird das heterologe Gen über die IRES der

15 viralen 5'-UTR translatiert; die Expression der viralen Gene erfolgt über eine zusätzlich eingefügte IRES-Sequenz des Enzephalomyocarditis-Virus (EMCV). Im Falle von BVDV wurde für die Herstellung einer persistent transfizierten MDBK-Zelllinie naturgemäß ein nichtzytopathisches (nzp), NS2-3-kodierendes Replikon verwendet (siehe Einleitung und Fig. 7 und 8). Im Falle von HCV wurde eine NS3-exprimierende RNA zur Herstellung persistent transfizierter

20 Huh-7-Zelllinien verwendet; diese induziert keinen ZPE (Lohmann *et al.*, 1999). Nach Transfektion der durch *in vitro*-Transkription gewonnenen RNAs (Standardprotokolle) wurden die Zellen unter selektionierenden Bedingungen, das heißt in der Gegenwart von 500 µg/ml Hygromycin, über mehrere Wochen gezüchtet. Da unter diesen Bedingungen nur Zellen überleben, die eine effiziente Hygromycin-Resistenz aufweisen, wurden so homogene

25 Zelllinien selektioniert, die das entsprechende "Hyg-bici"-BVDV- oder "Hyg-bici"-HCV-Replikon persistent enthalten. Der Vorteil dieses Replikon-Zellsystems besteht vor allem darin, dass Effekte auf die RNA-Replikation unabhängig von Virus-Entry/Internalisierung, Uncoating bzw. der Assemblierung und Sekretion von Nachkommenviren untersucht werden können. Die Hyg-bici-BVDV oder Hyg-bici-HCV-Replikon-Zelllinien wurden für 24 bis 30

30 Stunden mit verschiedenen PI behandelt (siehe unten). Die Auswirkungen der Proteasom-Inhibitoren auf die intrazelluläre Replikation der viralen RNAs wurde wiederum durch Messung der Replikationsprodukte der viralen RNAs durch quantitative RNase-Protektion bestimmt. Alternativ wurde der Effekt der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren auf die virale RNA-Replikation wie in Beispiel 2 beschrieben über Immunofluoreszenz-Tests oder durch

35 Immunoblot-Verfahren (Standardprotokolle) verfolgt. Es wurde festgestellt, dass verschiedene PI keinen oder einen nur geringen Einfluss auf die intrazelluläre RNA-Replikation von BVDV- und HCV-RNA haben: In Fig. 7 und 8 ist gezeigt, dass die Replikationsrate der Hyg-

bici-BVDV- oder Hyg-bici-HCV-Replikon-RNAs bei Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren nur geringfügig (d.h. um max 10%) sinkt.

[0090] Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition des zellulären Proteasoms keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Translation der viralen RNA, auf die Prozessierung des viralen Nicht-Struktur Polyproteins und auf die Katalyse der beiden Replikationsschritte der viralen RNA hat. Aufgrund der Diskrepanz zu den Ergebnissen mit infizierten Zellen – wie in Beispiel 2 beschrieben, ließ sich in diesen Fällen ein klarer Effekt von PI auf die RNA-Replikation feststellen – konnte geschlossen werden, dass Proteasom-Inhibitoren offenbar Vorgänge wie Virus-Entry/Internalisierung und/oder -Uncoating inhibieren, die der RNA-Replikation vorangehen.

Beispiel 4:

Die Behandlung von *Flaviviridae*-infizierten Zellen mit Proteasom-Inhibitoren führt zu Unterschieden in der Anzahl der in infizierten Zellen detektierbaren Viruspartikel, zu Veränderungen des Verhältnisses kompletter zu nicht-kompletter Virionen sowie zu Veränderungen in der Morphologie sekretierter Nachkommenviren.

[0091] In den vorangegangenen Experimenten (Beispiel 2) wurde festgestellt, dass eine Inhibition der zellulären Proteasom-Aktivität die Freisetzung von infektiösen Nachkommenviren drastisch reduziert. Die gleichzeitige Feststellung, dass Proteasom-Inhibitoren weder direkt auf die Viruspartikel noch auf die Zellmembran wirken (Beispiel 1) und auch die RNA-Replikation nicht beeinflussen (Beispiel 3), führte zu der Hypothese, dass entweder der Entry-/Internalisierungsvorgang bzw. das Uncoating oder aber die Assemblierung und die Sekretion von Nachkommenviren von der Inhibition des zellulären Proteasoms betroffen sein müssen. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden MDBK-Zellen mit BVDV infiziert und in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 μ M MG132 in speziellen Kapillaren mit einem Durchmesser von 200 μ m für weitere 30 Stunden gezüchtet. Anschließend wurden die Zellen chemisch fixiert und für TEM prozessiert. Analog wurde mit Virusüberständen von mit Proteasom-Inhibitor behandelten infizierten Monolayerkulturen bzw. Mock-behandelten Kontrollen verfahren: Die entsprechenden Virus-haltigen Zellkultur-Überstände wurden in die Kapillaren transferiert, verschlossen, chemisch fixiert und für TEM präpariert. Bei der elektronenmikroskopischen Analyse wurde deutlich, dass sich in infizierten Zellen nach einer Behandlung mit PI eine signifikant geringere Anzahl an Viruspartikeln in zellulären Vesikeln im Vergleich zur Mock-Kontrolle detektieren lässt (Fig. 9). Zudem war in PI-behandelten Zellen das Verhältnis von komplett assemblierten zu nicht-komplett assemblierten Virionen stark zu ungunsten der komplett assemblierten Viruspartikel verschoben. Beim Vergleich der aus PI und Mock-behandelten Zellen gewonnenen virus-haltigen Überstände wurde deutlich, dass die Morpho-

logie der unter PI-Behandlung sekretierten Viren im Vergleich zu Wild-Typ Viren deutlich verändert ist (Fig. 9). Diese Befunde stützen die Vorstellung, dass der inhibierende Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf eine Infektion mit *Flaviviridae* den Assemblierungs und/oder den Sekretionsprozess der Nachkommenviren betrifft.

Beispiel 5: Behandlung von Flaviviridae-infizierten Zellkulturen mit unterschiedlichen Klassen von Proteasom-Inhibitoren reduziert drastisch die Produktion von Nachkommenviren.

[0092] Parallelkulturen von MDBK-Zellen wurden wie in dem vorigen Beispiel beschrieben mit gleichen MOI des Pestivirus BVDV (CP7, NADL) infiziert. 3 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet, in PBS gewaschen und für weitere 12 Stunden kultiviert. Durch diesen ersten Waschschrift wurde das Input-Virus komplett aus der Kultur entfernt, und es können daher nur neu produzierte Nachkommenviren nachgewiesen werden. Nach weiteren 12 Stunden Behandlung wurden die Zellen ebenfalls geerntet, gewaschen, in gleichen Zellmengen aliquotiert und mit verschiedenen Proteasom-Inhibitoren für 24 oder 48 Stunden behandelt. Nach dieser Behandlungszeit wurden die Viren durch Zentrifugation aus identischen Volumen von Zellkulturüberständen durch Zentrifugation (99 min, 20.000xg, 4°C) gewonnen. Der jeweilige Zeitablauf für Infektion, Behandlung und Virusernte ist in Figur 10 dargestellt. Die pelletierten Virionen wurden in SDS-Probenpuffer denaturiert und im Western-Blot mit anti-BVDV-core-Antikörpern analysiert. In Figur 10, Teil A wurden die Western-Blots mit Antikörpern angefärbt, welche das reife und prozessierte BVDV-core erkennen; in Figur 10, Teil B mit Antikörpern, welche auch das unreife nicht prozessierte core-Protein erkennen. Dabei ist deutlich zu sehen, dass eine klare Abnahme der Menge an BVDV-core-Protein auftritt, welche von der Dosis der Proteasom-Inhibitoren abhängt. Der Effekt von 100 nM Epoxomicin war etwa vergleichbar mit dem inhibitorischen Effekt von 200nM des Peptid-aldehyds MG132. Die Hemmung der Produktion von BVDV wurde weiterhin verstärkt wenn die Behandlungsdauer auf 48 Stunden verlängert wurde (Figur 10, Teil B). Hierzu wurden Zellen mit den Proteasom-Inhibitoren Epoxomicin, MG132 sowie mit dem beta-Lacton Lactacystin behandelt (Figur 10, Teil B). Dabei zeigte sich eine Dosis-abhängige Verringerung des core-Signals, welches sowohl die reife als auch die unreife Form des BVDV-core-Proteins betraf. Gemessen am core-Signal ist nach 48 Stunden Behandlung mit 150 nM von MG132 oder Lactacystin eine Abnahme der Menge von BVDV Virus auf 10 Prozent zu verzeichnen (Figur 10, Teil B). In Übereinstimmung mit den vorherigen Beispielen wird mit diesem Beispiel weiterführend gezeigt, dass chemisch unterschiedliche Klassen von Proteasom-Inhibitoren die Produktion von BVDV-Virionen blockieren. Dies konnte anhand der biochemischen Analyse von pelletierten Virionen direkt nachgewiesen werden. Da dieser Effekt für Proteasom-Inhibitoren der Klasse von Peptid-aldehyden (MG132), Epoxyketonen (Epoxymicin), Peptid-vinylsulfonen (NLVS, Daten nicht gezeigt), und Lactonen (LC) nachgewiesen wurde, kann

somit davon ausgegangen werden, dass das 26S Proteasom für die Produktion von BVDV und damit anderen Vertretern der *Flaviviridae* notwendig ist, beziehungsweise Proteasom-Inhibitoren die Replikation von *Flaviviridae* blockieren können.

5

Legende zu den Figuren

Figur 1: Effekt von PI auf eine *Flaviviridae*-Infektion

Teil 1: Effekt einer Vorbehandlung von Zellen mit PI auf eine anschließende Infektion mit *Flaviviridae*.

10

[0093] BHK-21- bzw. MDBK-Zellen wurden für 20 Stunden bei einer Konzentration von 10nM Epoxomycin (E), Lactacystin (L) bzw. dem Proteasom-Inhibitor (Pi) MG132 im Kulturmedium kultiviert. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden diese mit West-Nil-Virus (BHK-21-Zellen) bzw. BVDV CP7 (MDBK-Zellen) bei einer MOI von 1-5 infiziert. 12 bzw. 30 Stunden nach der Infektion wurden der Titer und die spezifische Infektiosität der im Zellkultur-Überstand befindlichen Nachkommenviren (Protokolle siehe Anwendungsbeispiel 2) ermittelt.

15

[0094] Angegeben ist der Titer infektiöser West-Nil-Virus und BVDV-Nachkommenviren, die nach Infektion von PI-vorbehandelten im Vergleich zu Mock-vorbehandelten MDBK- bzw. BHK-Zellen freigesetzt wurden (Angaben als Verhältnis PI-vorbehandelt/Mock-vorbehandelt in %; Mock-vorbehandelt = 100%).

20

[0095] Angegeben ist weiterhin die spezifische Infektiosität der Nachkommenviren (Angaben wiederum als Verhältnis PI-vorbehandelt/Mock-vorbehandelt in %; Mock-vorbehandelt = 100%). Die Darstellung entspricht Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten (Standardabweichung ca. 10%).

25

Fig. 2: Effekt von PI auf eine *Flaviviridae*-Infektion

Teil 2: Konsequenzen einer Vorbehandlung von West-Nil-Viren und BVDV-CP7-Viren mit PI auf deren Infektiosität.

30

[0096] West-Nil-Virus-haltige bzw. BVDV-haltige Kulturüberstände wurden von infizierten Zellen gewonnen und der Virustiter bestimmt (Protokolle siehe Anwendungsbeispiel 2). 1ml der Überstände wurden je auf eine Konzentration von 10 nM verschiedener PI (Epoxomycin, Lactacystin, MG132) eingestellt. Die mit PI versetzten Überstände und eine entsprechende Mock-Kontrolle wurden für 30 Stunden bei 37° (Zellkulturbedingungen) inkubiert und anschließend zur Infektion von BHK-Zellen (West-Nil-Virus) und MDBK-Zellen (BVDV) eingesetzt. Der Titer und die spezifische Infektiosität der resultierenden Nachkommenviren wurden mit den unter Anwendungsbeispiel 2 beschriebenen Protokollen ermittelt.

35

[0097] Angegeben ist der Titer infektiöser BVDV- und West-Nil-Virus-Nachkommenviren, freigesetzt aus MDBK- bzw. BHK-Zellen, die zuvor entweder mit PI-behandelten oder Mock-behandelten Virus-Überständen infiziert wurden (Angaben als Verhältnis PI-vorbehandelt/Mock-vorbehandelt in %; Mock-vorbehandelt = 100%). Angegeben ist weiter-
5 hin die spezifische Infektiosität der Nachkommenviren (Angaben wiederum als Verhältnis PI-vorbehandelt/Mock-vorbehandelt in %; Mock-vorbehandelt = 100%). Die Darstellung entspricht Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten (Standardabweichung ca. 10%).

Fig. 3-5: Effekt von PI auf eine *Flaviviridae*-Infektion

10 Teil 3: Effekt einer PI-Behandlung auf bereits infizierte Zellen.

[0098] BHK-21- und MDBK-Zellen wurden mit BVDV bzw. West-Nil-Virus infiziert (Protokolle siehe Anwendungsbeispiel 2) und das Kulturmedium direkt im Anschluss an die Infektion auf 10nM verschiedener PI (Epoxomycin (E), Lactacystin (L), MG132 (Pi)) eingestellt. Nach Einstellung eines ZPE, i.d.R. 12 Stunden (West-Nil-Virus) bzw. 30 Stunden
15 (BVDV) nach der Infektion, wurde der Titer und die spezifische Infektiosität der freigesetzten Nachkommenviren ermittelt. Darüber hinaus wurde die Replikationsrate der viralen RNAs in den infizierten Zellen bestimmt (Protokolle erläutert in Anwendungsbeispiel 2).

[0099] Titer infektiöser West-Nil- und BVDV-Nachkommenviren, freigesetzt aus BHK- bzw. MDBK-Zellen, die nach der Infektion mit der angegebenen Konzentration und für die ange-
20 gegebenen Zeiten mit verschiedenen Proteasom-Inhibitoren (siehe Fig. 1 2 und 2 3) behandelt wurden. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Virus-Titrations mit jeweils unabhängigen Mock-Kontrollen (Standardabweichung ca. 20%).

[00100] Spezifische Infektiosität der Nachkommenviren im Verhältnis zu den mock-behandelten Kontrollen angegeben als Verhältnis PI-behandelt/Mock-behandelt in % (Mock-behandelt = 100%). Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten
25 (Standardabweichung ca. 20%).

[0100] Replikationsrate der Viren, ermittelt über RNase-Protektion der neu synthetisierten Positiv-Strang-RNA (Grassmann *et al.*, 1999) angegeben als Verhältnis PI-behandelt/Mock-behandelt in % (Mock-behandelt = 100%). Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhän-
30 gigen Experimenten (Standardabweichung ca. 10%).

Fig. 6: Effekt einer PI-Behandlung *Flaviviridae*-infizierter Zellen auf die Ausbreitung der Infektion in Zellkultur.

[0101] MDBK-Zellen wurden entsprechend den im Detail in Ausführungsbeispiel 2 erläuterten Protokollen mit BVDV CP7 infiziert und mit dem Proteasom-Inhibitor Pi behandelt. 30
35 Stunden nach der Infektion wurden die Proteasom-Inhibitor-behandelten Zellen und, zum Vergleich, unbehandelte und sonst unter identischen Bedingungen infizierte Zellen einem

Immunfluoreszenztest mit anti-BVDV-NS3-Antikörper unterzogen (Behrens *et al.*, 1998). Gezeigt sind die durch Immunfluoreszenz des viralen NS3-Proteins sichtbar gemachten Zellen (100-fach mikroskopisch vergrößert) in a) Abwesenheit des Proteasom-Inhibitors und b) nach Behandlung mit 10 nM Proteasom-Inhibitor MG132 (Pi).

5

Fig. 7 und 8: Effekt einer PI-Behandlung auf die Replikationsfähigkeit von BVDV- und HCV-Replikon-RNA

[0102] Organisation bizistronischer BVDV- und HCV-RNA-Replikons im Vergleich zur Organisation des BVDV- und HCV-Gesamtgenoms. Waagerechte Linien kennzeichnen die nicht-translatierten Regionen (UTRs); Boxen symbolisieren die translatierten Bereiche der viralen RNAs. Die Art der proteolytischen Aktivität, die an den gekennzeichneten Stellen des Polyproteins zur Spaltung führt, ist durch ein entsprechendes Symbol unter der Spaltstelle angegeben. „Het. Gen“ symbolisiert das in den bi-zistronischen RNAs exprimierte zusätzliche Gen (z.B. Hygromycin-B-Phosphattransferase). Aus Gründen der Prozessierung des N-Terminus von NS2-3 enthält das nzp BVDV-Replikon noch einen Teil des p7-kodierenden Bereiches. Ein Teilbereich des N^{pro}-Gens (N-terminale Autoprotease von BVDV) und ein Teilbereich des Capsid-Gens (bei HCV) dient der besseren Effizienz der IRES-medierten Translation des Polyproteins. Zur Generierung des authentischen N-Terminus der Proteine wurde z.T. ein Ubiquitingen („Ubi“) eingefügt: Auf diese Weise erfolgt die proteolytische Prozessierung des Polyproteins an dieser Stelle über die zelluläre Ubiquitin carboxy-terminale Hydrolase (Behrens *et al.*, 1998; für Review, siehe Lindenbach and Rice, 2001; weitere Erläuterungen im Text).

[0103] Homogene MDBK- bzw. Huh-7-Zelllinien, die das BVDV- bzw. HCV-Replikon persistent enthielten, wurden über mindestens 30 Stunden mit den verschiedenen Proteasom-Inhibitoren Epoxmycin (E), Lactacystin (L) und dem Proteasom-Inhibitor MG132 (Pi) behandelt. Im Anschluss daran wurden die Zellen von der Kulturplatte gelöst und die zytoplasmatische RNA über die in den Anwendungsbeispielen 2 und 3 beschriebenen Verfahren extrahiert. Der Nachweis und die Quantifizierung neu synthetisierter viraler Positiv-Strang-RNA erfolgte durch RNase-Protektion. In der Abbildung wird die Quantität der aus PI-behandelten Zellen extrahierten viralen RNA mit der aus Mock-behandelten Zellen extrahierten viralen RNA verglichen: Angegeben ist das Verhältnis der aus PI-behandelten Zellen gewonnenen Quantität an viraler RNA zu der aus Mock-behandelten Zellen gewonnenen Quantität an viraler RNA in % (Mock-behandelte RNA = 100%). Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (Standardabweichung ca. 10%). Immunfluoreszenztests ergaben konforme Ergebnisse (nicht gezeigt).

35

Fig. 9: Elektronenmikroskopische Studien PI-behandelter und Mock-behandelter MDBK-Zellen nach Infektion mit BVDV

[0104] MDBK-Zellen wurden entsprechend dem unter Anwendungsbeispiel 4 erläuterten Protokoll mit BVDV CP7 infiziert und elektronenmikroskopisch analysiert.

Fig. 10:

[0105] Unterschiedliche Klassen von PI blockieren die Produktion von BVDV CP7.

[0106] MDBK-Zellen wurden entsprechend den vorherigen Anwendungsbeispielen mit BVDV (CP7, NADL) infiziert. Zur vollständigen Entfernung des Inputvirus wurden die Zellen gewaschen und anschließend für 12 Stunden weiter behandelt, um eine vollständige Etablierung der Infektion zu ermöglichen. Nach erneuter Waschung wurden die Zellen für 24 oder 48 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Proteasom-Inhibitoren MG132, Epoxomycin, oder Lactacystin (LC) behandelt. Die freigesetzten Viren wurden geerntet und im Western-blot mit anti-BVDV-core-Antikörpern analysiert, welche entweder nur reifes (A) oder auch nicht prozessiertes core-(B)-Protein erkennen.

Abkürzungsverzeichnis

20	ATP	Adenosin-5'-triphosphat
	BHK	Baby Hamster Kidney
	BVDV	Virus der bovinen viralen Diarrhoe
	cDNA	copy DNA
	CFTR	Cystis Fibrosis Transmembran Regulator
25	CSFV	Virus der klassischen Schweinepest
	Da	Dalton (Maß für Molekulargewicht)
	DHBV	Enten-Hepatitis-B-Virus
	DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
	DTT	Dithiothreitol
30	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	EM	Elektronenmikroskopie
	EMCV	Enzephalomyocarditis-Virus
	FDA	Fluoresceindiazetat
	FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
35	GB-Viren	Hepatitis-GB-Viren
	HAART	highly active antiretroviral therapy
	HAART-Therapie	hoch aktive antiretrovirale Therapie

HAV	Hepatitis-A-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
5 HDV	Hepatitis-Delta-Virus
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HEV	Hepatitis-E-Virus
HFV	Hepatitis-F-Virus
HGV	Hepatitis-G-Virus
10 HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HPV	Humanes Papilloma-Virus
Huh-7	humane transformierte Hepatomazellen
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon
15 IL	Interleukin
IRES	interne Ribosomen-Eintrittsstelle
kb	Kilobasen
I κ B	inhibitorischer Faktor I κ B
kDa	Kilodalton (Maß für Molekulargewicht)
20 Ki	inhibitorische Konstante
LC	Lactacystin
LDL	Low density lipoprotein
MDa	Megadalton
MDBK	Marbin Darby Bovine Kindey
25 MHC	Major Histocompatibilitäts Komplex
μ M	micromolar
MG132	Proteasom-Inhibitor "MG132"
mM	millimolar
MOI	multiplicity of infection = Anzahl der pro Zelle eingesetzten
30	infektösen Viruspartikel
NF- κ B	Transkriptionsfaktor
NLVS	4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylactetyl-L-Leuciny-L-Leuciny-L-Leucin-vinyl-sulfon
nM	nanomolar
35 nzp	nicht zytopathisch
ORF	open reading frame (translationales Leseraster)
PBS	Phosphatpuffer, phosphate buffered saline

PCR	polymerase chain reaction - Polymerase-Kettenreaktion
PGPH	Postglutamyl-Peptid hydrolysierende
PNGase	Peptid N-Glykosidase
PI	Proteasom-Inhibitor(en)
5 PK	Proteinase K
PS	ProScript
PS-341	N-Pyrazinecarbonyl-L-Phenylalanin-L-leuzin-Borsäure
PS-519	1 <i>R</i> -[1 <i>S</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i>]-1-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-propyl-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptane-3,7-dion
10 PS-273	Morpholin-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH) ₂
PSI	N-Carbobenzoxyl-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
15 RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecylsulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TNF	Tumornekrosefaktor
20 Tris	Tris-Puffer - Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ub	Ubiquitin
UCH	Ubiquitincarboxyhydrolase
UPS	Ub-Proteasom-System
UTR	nicht-translatierte Region(en) (UTRs)
25 zLLL	N-carbobenzoxyl-L-leuciny-L-leuciny-L-leucinal
zp	zytopathisch
ZPE	zytopathischer Effekt der Virusinfektion

30 Literaturverzeichnis

Adams, J; Behnke, M; Chen, S; Cruickshank, AA; Dick, RL; Grenier, L; Klunder, JM; Ma, Y.-T; Plamondon, L; Stein, RL (1998). Potent and selective inhibition of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**:333-338.

35 Adams, J; Palombella, VJ; Sausville, EA; Johnson, J; Destree, A; Lazarus, DD; Maas, J; Pien, CS; Prakash, S; Elliott, PJ (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* **59**:2615-2622.

Adams, J; Palombella, VJ; Elliot, PJ (2000). Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. *Investigational New drugs* **18**:109-121.

Adams, J; Stein, R (1996). Novel inhibitors of the proteasome and their therapeutic use in inflammation. *Annu. Rep. Med. Chem.* **31**:279-288.

Agnello, V, Abel, G, Elfahal, M, Knight, GB, Zhang, QX; (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:12766-71.

Agnello, V; (2000). Mixed cryoglobulinemia and other extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infections. In: Liang, TJ, Hoonagle JH, eds. Hepatitis C. San Diego: Academic Press: 295-314.

Baldwin, AS (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:649-683.

Barton, DJ, Flanagan JB; (1993). Coupled translation and replication of poliovirus RNA *in vitro*: synthesis of functional 3D polymerase and infectious virus. *J. Virol.* **67**: 822-831.

Behrens, SE, Grassmann, CW, Thiel, HJ, Meyers, G, Tautz, N; (1998). Characterization of an autonomous subgenomic RNA-replicon of a pestivirus. *J. Virol.* **72**: 2364-2372.

Bukh, J, Miller RH, Purcell, RH; (1995). Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Sem.Liver Dis.* **15**: 41-63.

Burke, DS, Monath, TP; (2001). Flaviviruses. In: Virology, fourth edition edited by B.N. Fields, Lippincott-Raven Philadelphia, New York: 1043-1125.

Ciechanover, A (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell live. *EMBO J.* **17**: 7151-7160.

Ciechanover, A, Orian, A, Schwartz, AL; (2000). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J. Cell Biochem. Suppl.* **34**: 40-51.

Coux, O; Tanaka, K; Goldberg, AL (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 801-847.

Dubuisson, J, Hsu, HH, Cheung, RC, Greenberg, HB, Russell, DG, Rice, CM; (1994). Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis virus. *J. Virol.* **68**: 6147-6160.

Elliott, PJ, Ross JS; (2001). The proteasome: a new target for novel drug therapies. *Am J Clin Pathol.* **116**: 637-46.

Elliott, PJ; Pien, CS; McCormack, TA; Capman, ID; Adams, J (1999). Proteasome inhibition: a novel mechanism to combat asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**: 294-300.

Fenteany, G; Standaert, RF; Lane, WS; Choi, S; Corey, EJ; Schreiber, SL (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* **268**: 726-731.

Frankel, A; Man, S; Elliott, P; Adams, J; Kerbel, RS (2000). Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clinical Cancer Res.* **6**:3719-3728.

Fuerst, TR, Niles, EG, Studier, FW, Moss B; (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **83**: 8122-8126.

- Grassmann, CW, Isken, O, Behrens SE; (1999). Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. *J. Virol.* **73**: 9196-9205.
- Grassmann, CW, Isken, O, Tautz, N, Behrens SE; (2001). Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented *in trans*. *J. Virol.* **75**: 7791-7802.
- Hanada, M; Sugawara, K; Kaneta, K; Toda, S; Nishiyama, Y; Tomita, K; Yamamoto, H; Konishi, M; Oki, T (1992). Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J. Antibiot.* (Tokyo) **45**:1746-1752.
- Harty, RN; Brown, ME; Wang, G; Huibregtse, J; Hayes, FP; (2000). A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13871-13876.
- Hershko, A; Ciechanover, A; (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425-479.
- Higashitsuji, H; Itoh, K; Nagao, T; Dawson, S; Nonoguchi, K; Kido, T; Mayer, RJ; Arai, S; Fujita, J; (2000). Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nat Med.* **6**:96-99.
- Köck J, Nassal M, MacNelly S, Baumert TF, Blum HE, von Weizsäcker F; (2001). Efficient infection of primary *Tupaia* hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J. Virol.* **75**:5084-5089.
- Lohmann, V, Körner, F, Koch, JO, Herian, U, Theilmann, L., Bartenschlager R; (1999). *Science* **285**:110-113.
- Lightcap, ES; McCormack, TA; Pien, CS; Chau, V; Adams, J; Elliott, PJ (2000). Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin. Chem.* **46**:673-683.
- Lindenbach, BD, Rice, CM; (2001). Flaviviridae: the viruses and their replication. In: *Virology*, fourth edition edited by B.N. Fields, Lippincott-Raven Philadelphia, New York: 991-1042.
- Major, ME, Rehermann, B, Feinstone, SM; (2001). Hepatitis C viruses. In: *Virology*, fourth edition edited by B.N. Fields, Lippincott-Raven Philadelphia, New York: 1127-1161.
- Meng, L; Kwok, BH; Sin, N; Crews, CM (1999a). Eponemycin exerts its antitumor effect through the inhibition of proteasome function. *Cancer Res.* **59**:2798-2801.
- Meng, L; Mohan, R; Kwok, BH; Eloffson, M; Sin, N; Crews, CM (1999b). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**(18): 10403-10408.
- Merola, M, Brazzoli, M, Cochiarella, F, Heile, JM, Helenius, A, Weiner, AJ, Houghton, M, Abrignani, S; (2001). Folding of Hepatitis C Virus E1 glycoprotein in a cell-free system. *J. Virol.* **75**: 11205-11217.
- Meyers, G, Tautz, N, Becher, P, Thiel, H-J, Kümmerer BM; (1996). Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.* **70**: 8606-8613.
- Moormann, RJM, van Gennip, HGP, Miedema, GKL, Hulst, MM, van Rijn PA; (1996). Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J. Virol.* **70**: 763-770.

Moradpour, D; Grabscheid, B; Kammer, AR; Schmidtke, G; Gröttrup, M; Blum, HE; Cerny, A (2001). Expression of hepatitis C virus proteins does not interfere with major histocompatibility complex class I processing and presentation in vitro. *Hepatology* 33:1282-1287.

5 Müller, K, Heimann, M, Rümenapf, T; (2000). Evidences that CD46 is involved in BVDV infection. Keystone symposium: Cell biology of virus entry, replication and pathogenesis. Taos, NM, Abstract supplement.

10 Palombella, VJ; Conner, EM; Fuseler, JW; Destree, A; Davis, JM; Laroux, FS; Wolf, RE; Huang, J; Brand, S; Elliott, PJ; Lazarus, D; McCormack, T; Parent, L; Stein, R; Adams, J; Grisham, MB; (1998). Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15671-15676.

Palombella, VJ; Rando, OJ; Goldberg, AL; Maniatis, T; (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78:773-785.

15 Pamer, E; Cresswell, P; (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16:323-358.

Patnaik, A, Chau, V, Wills, JW; (2000). Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13069-13074.

20 Pietschmann, T, Lohmann, V, Kaul, A, Krieger, N, Rinck, G, Rutter, G, Strand, D, Bartenschlager, R; (2002) Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J. Virol.* 76:4008-21.

Phillips, JB; Williams, AJ; Adams, J; Elliott, PJ; Tortella, FC (2000). Proteasome inhibitor PS-519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 31:1686-1693.

25 Reherrmann, B; Ferrari, C; Pasquinelli, C; Chisari, FV (1996). The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med.* 2:1104-1108.

Rock, KL; Gramm, C; Rothstein, L; Clark, K; Stein, R; Dick, L; Hwang, D; Goldberg, AL (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761-771.

30 Rock, KL; Goldberg, AL (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17:739-779.

Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, JH, and Thiel, HJ; (1993). Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.* 67: 3288-3294.

35 Schubert, U; Antón, LC; Gibbs, J; Norbury, CC; Yewdell, JW; Bennink, JR (2000b). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770-774.

40 Schubert, U; Ott, DE; Chertova, EN; Welker, R; Tessmer, U; Princiotta, MF; Bennink, JR; Kräusslich, H-G; Yewdell, JW (2000a). Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13057-13062.

Schwartz, AL; Ciechanover, A (1999). The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu. Rev. Med.* 50:57-74.

- Strack, B; Calistri, A; Accola, MA; Palu, G; Göttinger, HG (2000). A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13063-13068.
- Suzuki, R; Tamura, K; Li, J; Ishii, K; Matsuura, Y; Miyamura, T; Suzuki, T (2001). Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* 280:301-309.
- Teicher, BA; Ara, G; Herbst, R; Palombella, VJ; Adams, J (1999). The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 5:2638-2645.
- Thiel, HJ, Plagemann, PGW, Moennig, V; (1996). Pestiviruses. In B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley (ed.), *Fields virology*. Raven Press, Philadelphia. Pa.: 1059-1074.
- 10 Trautwein, C; Manns, M (2001). Antivirale Therapie der chronischen Virushepatitis. *Internist* 42:913-923.
- Yagi, T; Hardin, JA; Valenzuela, YM; Miyoshi, H; Gores, GJ; Nyberg, SL (2001). Caspase inhibition reduces apoptotic death of cryopreserved porcine hepatocytes. *Hepatology* 33:1432-40.
- 15 Yu, H, Grassmann, CW, Behrens SE; (1999). Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. *J. Virol.* 73: 3638-3648.
- 20 Yu, H, Isken, O, Grassmann, CW, Behrens SE; (2000). A stem-loop motif formed by the immediate 5'-terminus of the bovine viral diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J. Virol.* 74: 5825-5835.
- Zhao, X, Tang Z, Klumpp B, Wolff-Vorbeck, G, Barth H, Levy S, von Weizsäcker, F, Blum HE, Baumert TF; (2002). Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J. Clin. Invest.* 109: 221-232.

Patentansprüche

1. Mittel zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Mitgliedern der Familie Flaviviridae – Genera: Flavivirus, Pestivirus, Hepacivirus – dadurch gekennzeichnet, dass sie als wirksame Komponente mindestens einen Proteasom-Inhibitor in einer pharmazeutischen Zubereitung enthalten.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Hepatitis-C-Virus (HCV), zur Behandlung und Prophylaxe von HCV-bedingten Hepatitiden, Flavivirus-bedingtem Fieber, Hämorrhagien, Leukopenie, Thrombozytopenie, Durchfallerkrankungen und Encephalitiden sowie Pestivirus-verursachten Krankheiten eingesetzt werden.
3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden,
 - 3.1. welche die Aktivitäten des Ubiquitin/Proteasom-Pathway hemmen, regulieren oder anderweitig beeinflussen
 - 3.2. die speziell die enzymatischen Aktivitäten des kompletten 26S Proteasom-Komplexes und
 - 3.3. die speziell die enzymatischen Aktivitäten des freien, nicht mit regulatorischen Untereinheiten assemblierten 20S katalytisch aktiven Proteasom-Komplexes beeinflussen.
4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die als Proteasom-Inhibitoren von Zellen höherer Eukaryoten aufgenommen werden und nach Zellaufnahme mit den katalytischen Untereinheiten des Proteasoms in Wechselwirkung treten und dabei alle oder einzelne proteolytische Aktivitäten des Proteasoms – die Trypsin-, die Chymotrypsin- und die Postglutamyl-Peptid hydrolysierenden Aktivitäten – innerhalb des 26S oder auch des 20S Proteasomkomplexes blockieren.
5. Mittel nach Anspruch 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutischen Zubereitungen neben Proteasom-Inhibitoren auch andere Mittel enthalten, welche das zelluläre Ubiquitin-System beeinflussen, regulieren oder hemmen, wie die Aktivitäten
 - 5.1. der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme und/oder
 - 5.2. der Ubiquitin-hydrolysierenden Enzyme.

6. Mittel nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die in verschiedenen Formen *in vivo* oral, intravenös, intramuskulär, subkutan oder in verkapselter Form mit oder ohne Zell-Spezifität-tragende Veränderungen verabreicht werden, aufgrund der Anwendung eines bestimmten Applikations- und/oder Dosis-Regimes eine geringe Zytotoxizität aufweisen, keine oder unbedeutende Nebenwirkungen auslösen, eine relative hohe metabolische Halbwertszeit und eine relative geringe Clearance-Rate im Organismus aufweisen.
7. Mittel nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die
- a) in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden oder
 - b) durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen oder
 - c) total-synthetisch hergestellt werden oder
 - d) durch gentherapeutische Verfahren *in vivo* synthetisiert werden.
8. Mittel nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die folgenden Substanzklassen angehören:
- 8.a) natürlich vorkommende Proteasom-Inhibitoren:
- Peptid-Derivate, welche C-terminal Epoxyketon-Strukturen enthalten
 - β -Lacton-Derivate
 - Aclacinomycin A (auch bezeichnet als Aclarubicin)
 - Lactacystin und dessen chemische modifizierte Varianten, wie der Zellmembranpenetrierenden Variante "Clastolactacystein β -Lacton"
- 8.b) synthetisch hergestellte Proteasom-Inhibitoren:
- modifizierte Peptidaldehyde, wie N-carbobenzoxyl-L-leucinyll-L-leucinyll-L-leucinal (auch bezeichnet als MG132 oder zLLL), dessen Borsäure-Derivat MG232; N-Carbobenzoxyl-Leu-Leu-Nva-H (bezeichnet als MG115; N-Acetyl-L-Leuzinyll-L-Leuzinyll-L-Norleuzinal (bezeichnet als LLnL), N-Carbobenzoxyl-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H (auch bezeichnet als PSI);
- 8.c) Peptide, welche C-terminal eine α,β -Epoxyketon-Struktur tragen, ferner Vinyl-sulfone, wie
- 8.d)1. Carbobenzoxyl-L-Leucinyll-L-Leucinyll-L-Leucin-vinyl-sulfon oder
- 8.d)2. 4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylactetyl-L-Leucinyll-L-Leucinyll-L-Leucin-vinyl-sulfon (NLVS)
- 8.d) Glyoxal- oder Borsäure-Reste, wie
- 8.d)1. Pyrazyl-CONH(CHPh)CONH(CHisobutyl)B(OH)₂ sowie

8.d)2. Dipeptidyl-Borsäure-Derivate oder

8.e) Pinacol-Ester - wie Benzyloxycarbonyl(Cbz)-Leu-Leu-boroLeu-Pinacol-Ester.

9. Mittel nach Anspruch 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass als besonders geeignete Proteasom-Inhibitoren die Epoxyketone

9.1. Epoxomicin (Epoxomycin, Molekülformel: $C_{28}H_{36}N_4O_7$) und/oder

9.2. Eponemicin (Eponemycin, Molekülformel: $C_{20}H_{36}N_2O_5$)

eingesetzt werden.

10. Mittel nach Anspruch 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass als besonders geeignete Proteasom-Inhibitoren aus der PS-Serie die Verbindungen

10.1. PS-519 als β -Lacton - sowie als Lactacystin-Derivat die Verbindung 1R-[1S, 4R,5S]]-1-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-propyl-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptane-3,7-dione - Molekülformel $C_{12}H_{19}NO_4$ - und/oder

10.2. PS-314 als Peptidyl-Borsäure-Derivat die Verbindung N-Pyrazinecarbonyl-L-Phenylalanin-L-Leuzin-Borsäure - Molekülformel $C_{19}H_{25}BN_4O_4$ - und/oder

10.3. PS-273 (Morpholin-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und dessen Enantiomer PS-293 und/oder

10.4. die Verbindung PS-296 (8-Quinolyl-sulfonyl-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder

10.5. PS-303 (NH₂(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder

10.6. PS-321 als (Morpholin-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-Phenylalanin)-B(OH)₂); - und/oder

10.7. PS-334 (CH₃-NH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-Isobutyl)-B(OH)₂) und/oder

10.8. die Verbindung PS-325 (2-Quinol-CONH-(CH-*homo*-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder

10.9. PS-352 (Phenylalanin-CH₂-CH₂-CONH-(CH-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder

10.10. PS-383 (Pyridyl-CONH-(CH-*p*F-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂)

eingesetzt werden.

11. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren der Ansprüche 1 bis 10 zur Hemmung des Entry-/Internalisierungsvorganges, der Reifung sowie der Freisetzung von Flaviviridae.

12. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Hemmung von späten Prozessen im Lebenszyklus von Flaviviridae.

13. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Proteasom-Inhibitoren die Produktion von infektiösen Virionen von Flaviviridae-infizierten Zellen weitgehend oder vollkommen durch Blockierung unterbinden.

14. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Proteasom-Inhibitoren die Hemmung der Freisetzung von Virionen wie auch eine nahezu vollständige Reduktion der Infektiosität der freigesetzten Virionen bewirken.

15. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Proteasom-Inhibitoren die Virusvermehrung und somit die Neuinfektion von Wirtszellen und damit die Ausbreitung einer Infektion *in vivo*, im Falle von Hepatitis-C-Virus, im Lebergewebe eines Infizierten unterdrücken.

16. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Hemmung der Vermehrung von Flaviviridae nach den Mechanismen

a) Blockierung/Reduktion der Freisetzung von neuen Virionen

b) Blockierung/Reduktion der Infektiosität von freigesetzten Virionen

c) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in Kulturen von Wirtszellen

d) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in infizierten Organen *in vivo*.

17. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Unterdrückung von Flavivirus-Infektionen und Pestivirus-Infektionen bei Menschen und Tieren.

18. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Induktion des Absterbens von Hepato-Karzinomzellen.

19. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 18 zur Unterdrückung und/oder Verhinderung des Entstehens von Leberzell-Karzinomen.

20. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 18 und 19 zur Therapie von Patienten mit etablierten Leberzellkarzinomen.

21. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 18 bis 20 zur Behandlung/Bekämpfung/Verhinderung von

21.1. HCV-induzierter Leberzirrhose und/oder

21.2. HCV-induzierten Leberzellkarzinomen

21.3. Medikamenten-induzierten Leberkarzinomen

21.4. genetisch bedingten Leberkarzinomen

21.5. durch Umwelt-bedingten Leberkarzinomen und/oder

21.6. durch eine Kombination viraler und nichtviraler Faktoren bedingten Leberkarzinomen.

22. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 18 bis 21 zur gezielten Eliminierung von Leberkarzinomzellen, welche infolge einer

22.1. HCV-Infektion oder

22.2. entsprechenden Koinfektion von HCV und Hepatitis-B-Virus (HBV) oder

22.3. Hepatitis-Delta-Virus (HDV)/HBV/HCV-Koinfektion

22.4. Humanes Immundefizienzvirus (HIV)/HCV-Koinfektionen oder

22.5. HCV und Koinfektionen mit anderen Viren, Bakterien oder Parasiten entstehen.

23. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 18 bis 22 zur Verhinderung der Entstehung, des Wachstums und der Metastasierung von Leberzelltumoren sowie zur bevorzugten Zerstörung von Leberkarzinomzellen in HCV-infizierten Patienten.

24. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Modulation der Expression, Modifizierung und Aktivität des Tumorsuppressor-Proteins p53 und anderer Tumorsuppressorproteine, die bei hepatozellulären Karzinomen (HCC) von Belang sind.

25. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Leberzellregeneration bei Patienten mit Leberentzündung.

26. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Regeneration von Patienten nach Flavivirus-Infektionen.

27. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Regeneration von Stalltieren nach Flavivirus- oder Pestivirus-Infektionen.

28. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Reduktion der Anzahl infizierter Virus-produzierender Zellen im Leberzellgewebe.

29. Verwendung nach Anspruch 11-14, dadurch gekennzeichnet, dass Proteasom-Inhibitoren die post-translationale Modifikation und proteolytische Prozessierung von Flaviviridae-

Strukturproteinen verändern sowie die Dimerisierungsfähigkeit der Virus-Envelope-Proteine herabsetzen und dadurch die Freisetzung und Infektiosität von Flaviviridae herabsetzen oder blockieren.

- 5 30. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Hemmung sowohl der Erhaltung und Persistenz einer bereits etablierten Infektion als auch einer Sekundärinfektion und somit der Ausbreitung einer Infektion, einschließlich der Blockierung der Ausbreitung einer Flaviviridae-Infektion in vivo.
- 10 31. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 7 bis 11 in Kombination untereinander zur Behandlung und Bekämpfung von HCV-bedingten Hepatitiden, Flavivirus-bedingtem Fieber, Hämorrhagien und Encephalitiden sowie Pestivirus-verursachten Krankheiten.
- 15 32. Verwendung nach Anspruch 31 in Kombination mit bereits in der anti-viralen Therapie von Flaviviridae-Infektionen verwendeten Therapeutika.
33. Verwendung nach Anspruch 31 und 32 zur Behandlung von Koinfektionen verschiedener Flaviviren und Pestiviren.
- 20 34. Verwendung nach Anspruch 31 und 32 zur Behandlung von Koinfektionen von HCV und Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2.
- 35 35. Verwendung nach Anspruch 34 zur Behandlung von HCV/HIV-Koinfektionen in Kombination mit der HAART-Therapie.
- 25 36. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei Leber- und anderen Organtransplantationen.
- 30 37. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei Zelltherapien durch Gabe der Mittel vor, während und nach der Transplantation.
- 35 38. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei der Transplantation von virusfreien Organen auf chronische Virusträger, die immer Restvirus haben und neue Organe infizieren können wie auch bei der Übertragung von Virus-haltigen Organen von Spendern auf virusfreie Patienten.

39. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Verhinderung der Etablierung einer systemischen Flaviviridae-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösem Virus.

5

40. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Vorbeugung einer Flaviviridae-Infektion bei Personen mit hohem Risiko einer Neuinfektion, wie bei Ärzten, Risiko-Personal in Häusern mit hohem Besucherverkehr, Drogenabhängigen, Reisenden in hochendemische Gebiete für Flaviviridae, in der Krankenbehandlung oder für Familienangehörige von chronischen Virusträgern.

10

41. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Minderung oder Eliminierung einer Leberentzündung durch Immunsystem-vermittelte Mechanismen.

15

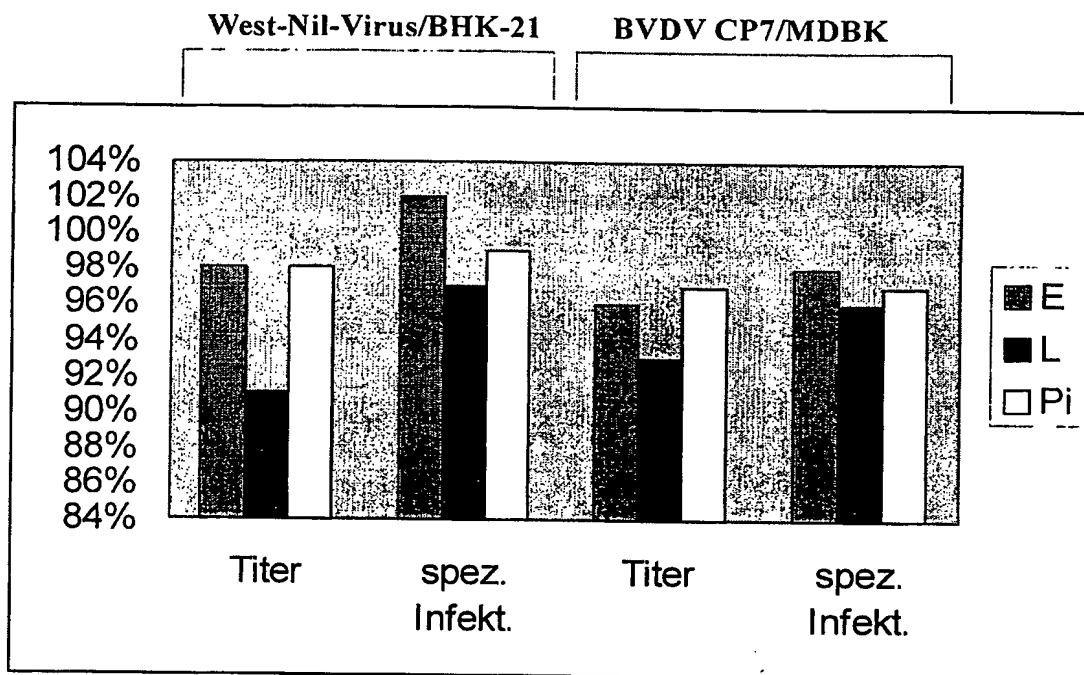
42. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 7 bis 11 zur Herstellung von Mitteln und/oder pharmazeutischen Zubereitungen zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Flaviviridae.

20

43. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 42 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe von HCV-bedingten Hepatitiden, Flavivirus-bedingtem Fieber, Hämorrhagien und Encephalitiden sowie Pestivirus-verursachten Krankheiten.

Figur 1

1 / 8

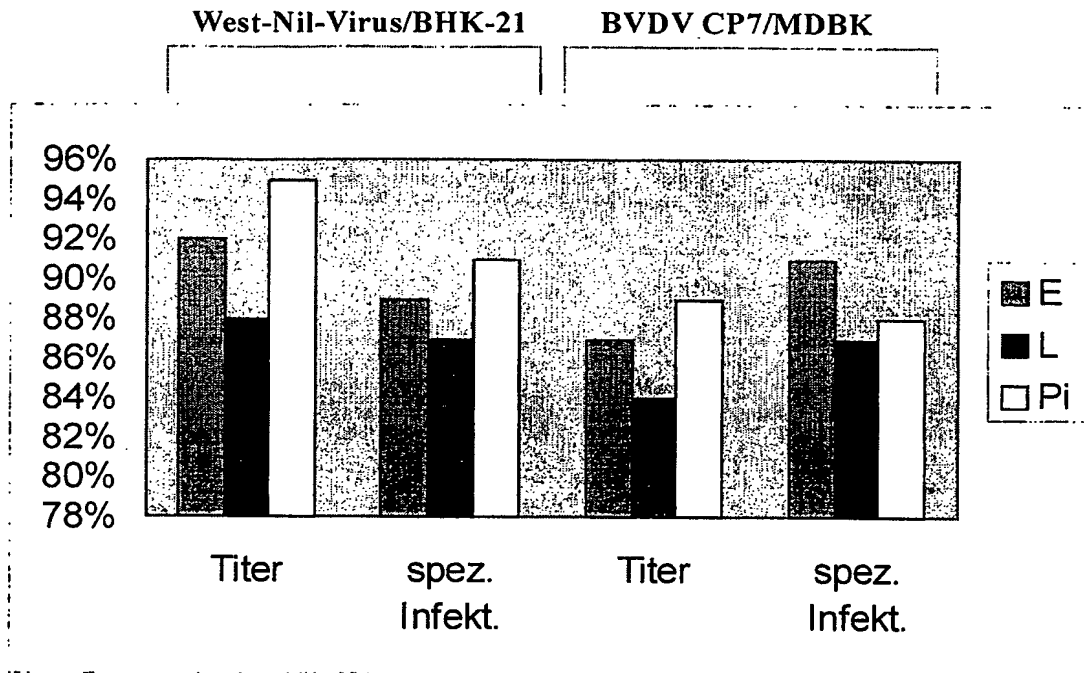


Werte:

Titer (WN)r	spez. Infekt. (WN).	Titer (BVDV)	spez. Infekt. (BVDV)
(E) 98%	(E) 102%	(E) 96%	(E) 98%
(L) 91%	(L) 97%	(L) 93%	(L) 96%
(Pi) 98%	(Pi) 99%	(Pi) 97%	(Pi) 97%

Figur 2

2 / 8

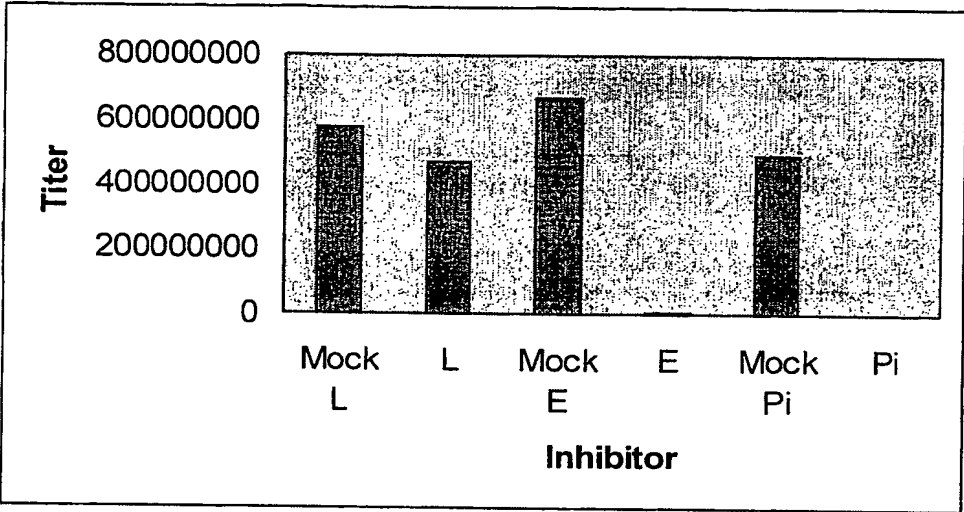


Werte:

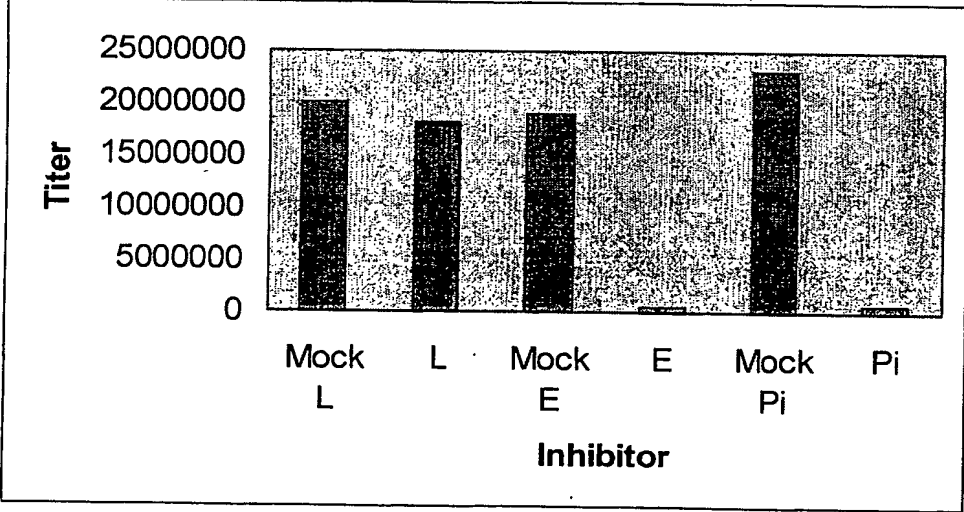
Titer (WN)	spez. Infekt. (WN)	Titer (BVDV)	spez. Infekt. (BVDV)
(E) 92%	(E) 89%	(E) 87%	(E) 91%
(L) 88%	(L) 87%	(L) 84%	(L) 87%
(Pi) 95%	(Pi) 91%	(Pi) 89%	(Pi) 88%

Figur 3

West-Nil-Virus/BHK



BVDV CP7/MDBK



Werte:

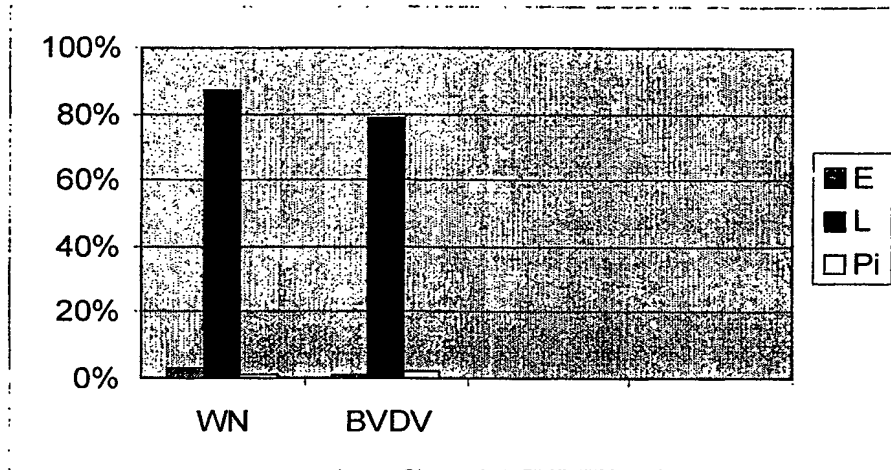
Mock L (WN)	L (WN)	Mock E (WN)	E (WN)	Mock Pi (WN)	Pi (WN)
5800000000	4700000000	6700000000	450000	4900000000	280000

Mock L (BVDV)	L (BVDV)	Mock E (BVDV)	E (BVDV)	Mock Pi (BVDV)	Pi (BVDV)
20000000	18000000	19000000	540000	23000000	740000

Figur 4

4 / 8

spez. Infektiösität

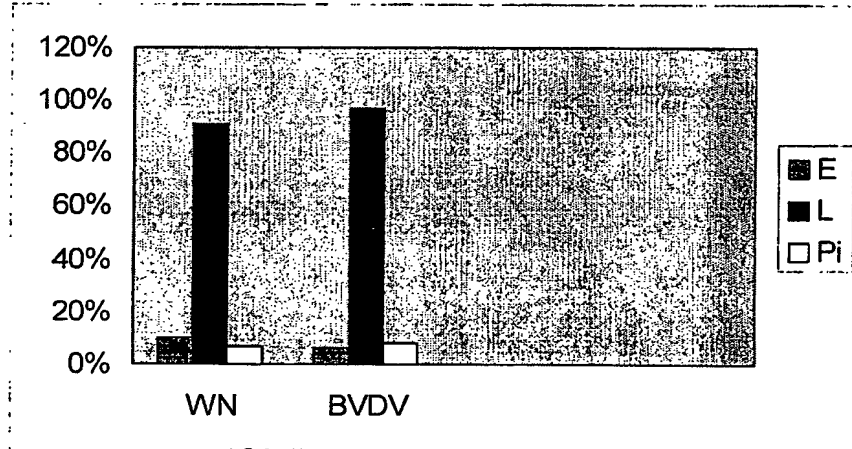


Werte:

WN	BVDV
(E) 3%	(E) 1%
(L) 87%	(L) 79%
(Pi) 1%	(Pi) 2%

Figur 5

Replikationsrate



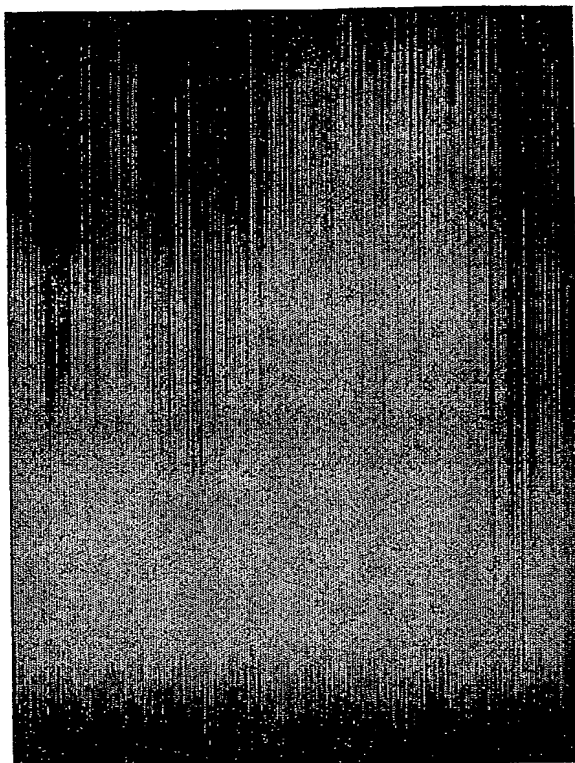
Werte:

WN	BVDV
(E) 3%	(E) 1%
(L) 87%	(L) 79%
(Pi) 1%	(Pi) 2%

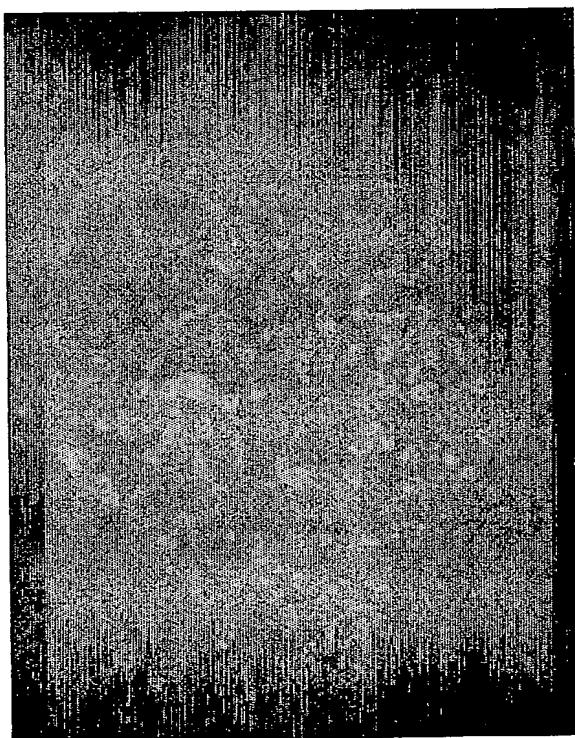
Figur 6

5/8

b)



a)



Figur 6

5/8

b)

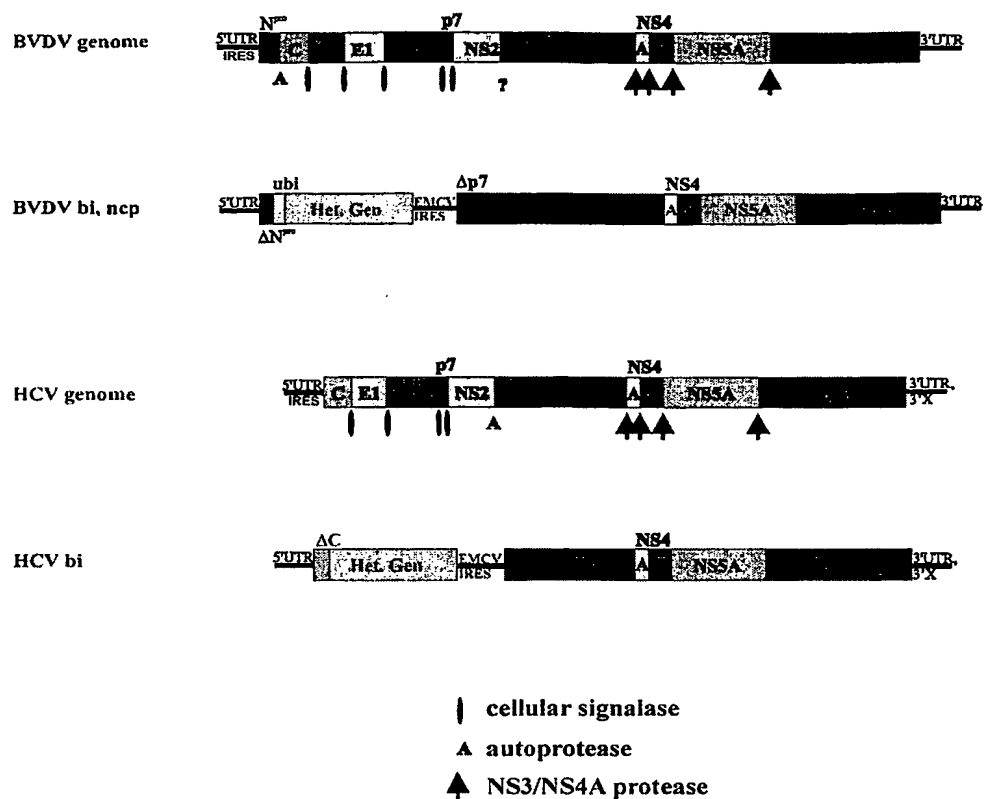


a)

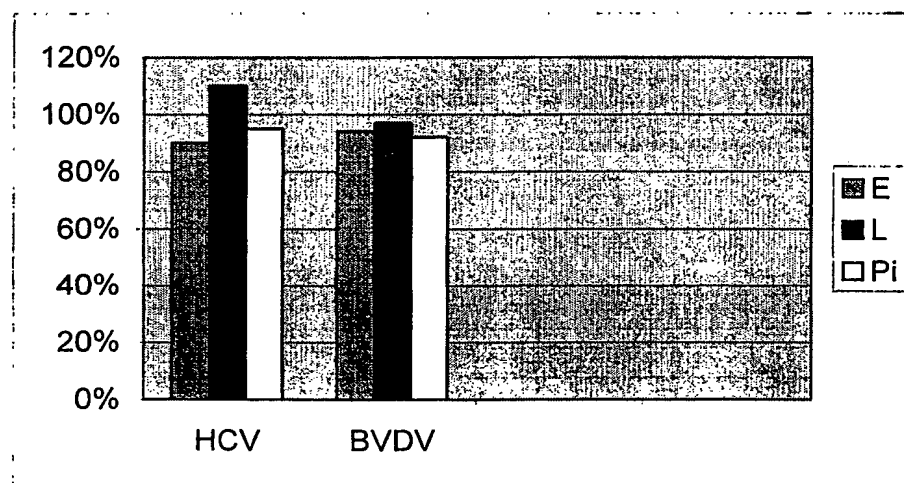


Figur 7

6 / 8



Figur 8

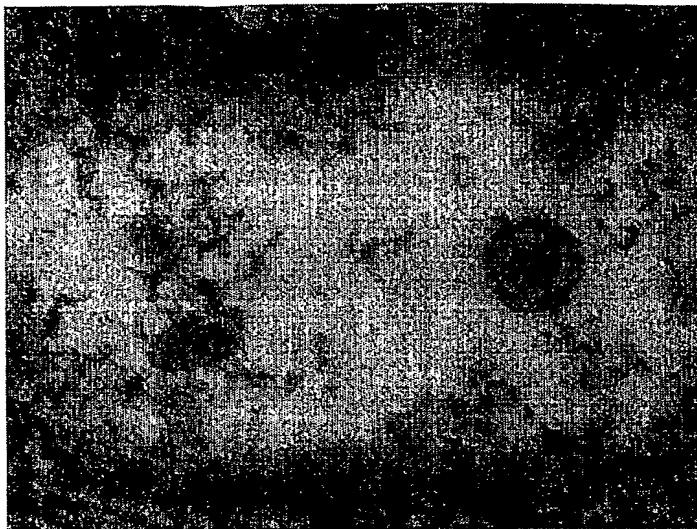


Werte:

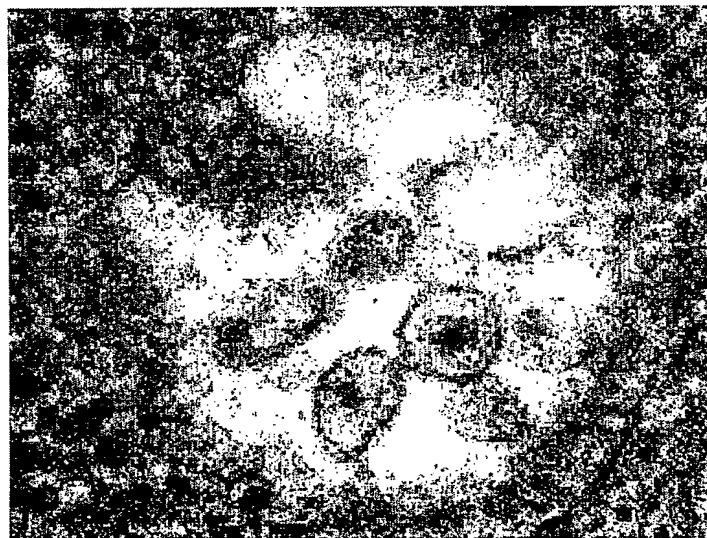
HCV	BVDV
(E) 90%	(E) 94%
(L) 110%	(L) 97%
(Pi) 95%	(Pi) 92%

Figur 8

infiziert/Pi - behandelt



infiziert/unbehandelt

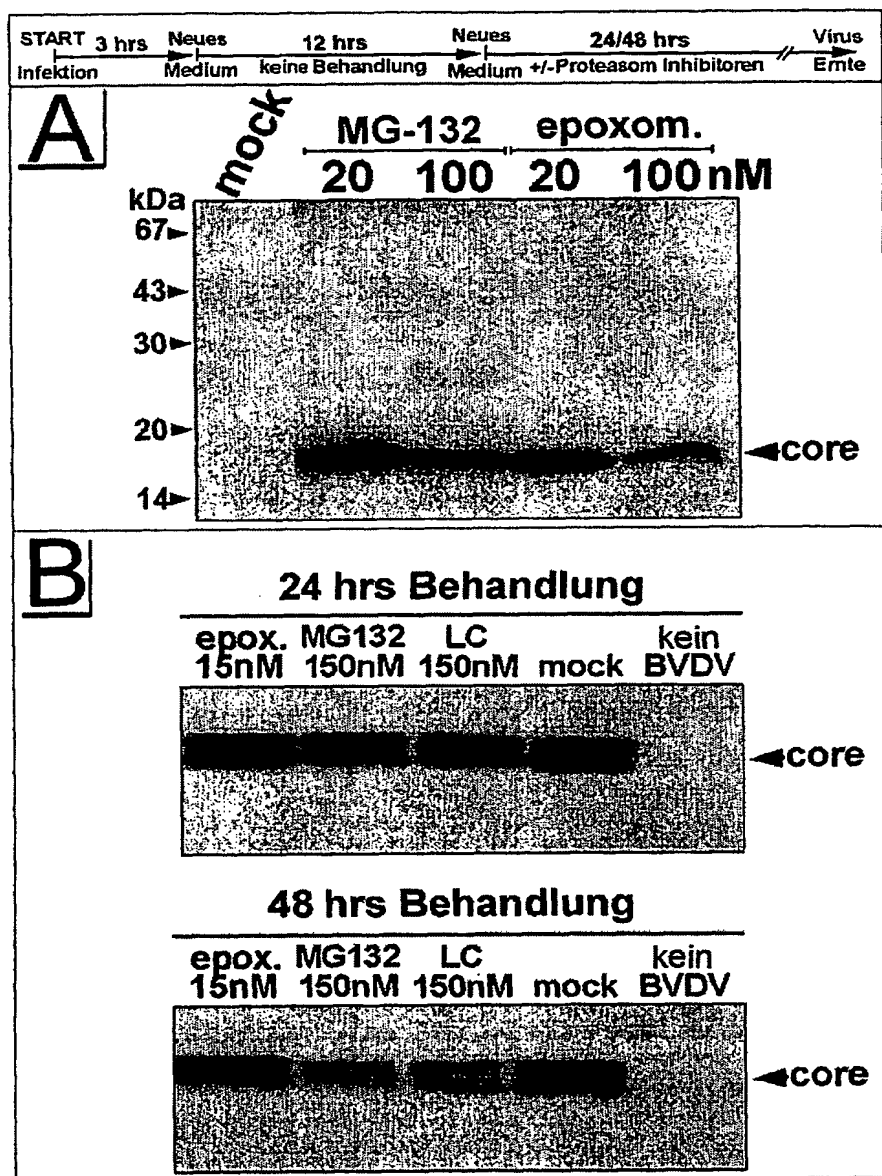


nicht infiziert



Figur 10

8 / 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT 03/01213

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/69 A61K31/11 A61K38/06 A61K31/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 22729 A (RECH DU CENTRE HOSPITALIER DE ;WANG XIN (CA); WU JIANGPING (CA)) 14 May 1999 (1999-05-14) cited in the application claims 1,6,13	1-8, 18-21,43
X	US 6 297 217 B1 (GRENIER LOUIS ET AL) 2 October 2001 (2001-10-02) claims 1,17,18	1-8,10, 18-21
P,X	WO 02 30455 A (TESSMER UWE ;WILL HANS (DE); HOHENBERG HEINZ (DE); SCHUBERT EVELYN) 18 April 2002 (2002-04-18) claims 9,10,32,34-36,41	1-10,15, 18-23

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 July 2003

Date of mailing of the international search report

29/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ludwig, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DK/01213

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9922729	A	14-05-1999	AU 9731898 A	24-05-1999
			WO 9922729 A1	14-05-1999
			EP 0967976 A1	05-01-2000
			JP 2001508465 T	26-06-2001
US 6297217	B1	02-10-2001	US 6066730 A	23-05-2000
			US 5780454 A	14-07-1998
			US 6083903 A	04-07-2000
			US 2002173488 A1	21-11-2002
			US 6465433 B1	15-10-2002
			AT 241631 T	15-06-2003
			AU 710564 B2	23-09-1999
			AU 4139896 A	23-05-1996
			CA 2203936 A1	09-05-1996
			CN 1168633 A	24-12-1997
			DE 69530936 D1	03-07-2003
			EP 1312609 A1	21-05-2003
			EP 0788360 A1	13-08-1997
			FI 971746 A	06-06-1997
			JP 10510245 T	06-10-1998
			NO 971929 A	12-06-1997
			NZ 296717 A	29-11-1999
			NZ 337211 A	22-12-2000
			WO 9613266 A1	09-05-1996
			ZA 9509119 A	27-05-1996
WO 0230455	A	18-04-2002	DE 10051716 A1	25-04-2002
			DE 10149398 A1	24-04-2003
			AU 1813302 A	22-04-2002
			WO 0230455 A2	18-04-2002
			EP 1326632 A2	16-07-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/DE/01213

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 A61K31/69 A61K31/11 A61K38/06 A61K31/16

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 22729 A (RECH DU CENTRE HOSPITALIER DE ;WANG XIN (CA); WU JIANGPING (CA)) 14. Mai 1999 (1999-05-14) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1,6,13	1-8, 18-21,43
X	US 6 297 217 B1 (GRENIER LOUIS ET AL) 2. Oktober 2001 (2001-10-02) Ansprüche 1,17,18	1-8,10, 18-21
P,X	WO 02 30455 A (TESSMER UWE ;WILL HANS (DE); HOHENBERG HEINZ (DE); SCHUBERT EVELYN) 18. April 2002 (2002-04-18) Ansprüche 9,10,32,34-36,41	1-10,15, 18-23



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Juli 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/07/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ludwig, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu der Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/D/01213

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9922729	A	14-05-1999	AU 9731898 A 24-05-1999
		WO 9922729 A1	14-05-1999
		EP 0967976 A1	05-01-2000
		JP 2001508465 T	26-06-2001
US 6297217	B1	02-10-2001	US 6066730 A 23-05-2000
		US 5780454 A	14-07-1998
		US 6083903 A	04-07-2000
		US 2002173488 A1	21-11-2002
		US 6465433 B1	15-10-2002
		AT 241631 T	15-06-2003
		AU 710564 B2	23-09-1999
		AU 4139896 A	23-05-1996
		CA 2203936 A1	09-05-1996
		CN 1168633 A	24-12-1997
		DE 69530936 D1	03-07-2003
		EP 1312609 A1	21-05-2003
		EP 0788360 A1	13-08-1997
		FI 971746 A	06-06-1997
		JP 10510245 T	06-10-1998
		NO 971929 A	12-06-1997
		NZ 296717 A	29-11-1999
		NZ 337211 A	22-12-2000
		WO 9613266 A1	09-05-1996
		ZA 9509119 A	27-05-1996
WO 0230455	A	18-04-2002	DE 10051716 A1 25-04-2002
		DE 10149398 A1	24-04-2003
		AU 1813302 A	22-04-2002
		WO 0230455 A2	18-04-2002
		EP 1326632 A2	16-07-2003

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.